

524,419

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 2 月 26 日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/016792 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/74, 1/21, C12P  
21/02, C12Q 1/02, 1/68, C07K 14/47

1 7 丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究  
所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010209

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5  
森ビル 3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 11 日 (11.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-235008 2002 年 8 月 12 日 (12.08.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-  
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区  
霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 信孝  
(NAKASHIMA, Nobutaka) [JP/JP]; 〒062-8517 北海  
道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独  
立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター  
内 Hokkaido (JP). 田村 具博 (TAMURA, Tomohiro)  
[JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL EXPRESSION VECTOR SUITABLE FOR EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEIN AT LOW TEM-  
PERATURE

(54) 発明の名称: 低温での組み換えタンパク質の発現に適した新規発現ベクター

(57) Abstract: It is intended to provide an expression vector of the induction type whereby a protein can be expressed at a low temperature, and a method of expressing a protein at a low temperature with the use of this vector. Namely, an expression vector of the induction type capable of inducing the expression of a gene encoding a protein, the expression product of which inhibits the proliferation of host cells at a moderate to high temperature exceeding about 15°C, in host cells which can proliferate under low temperature conditions.

(57) 要約: 低温でタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび該ベクターを用いて低温でタンパク質を発現させる方法の提供。 約15°Cを超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な宿主細胞中で誘導発現し得る誘導型発現ベクター。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/016792 A1

## 明 細 書

## 低温での組み換えタンパク質の発現に適した新規発現ベクター

## 技術分野

本発明は、Rhodococcus 属細菌中で外来遺伝子を誘導発現し得る発現ベクターに関する。

また、本発明は、低温において宿主細胞中で組み換えタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび該ベクターを用いて低温で組み換えタンパク質を発現させる方法に関する。さらに、本発明は約 15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターおよび該ベクターを含む低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌を用いて約 15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害する組み換えタンパク質を低温で発現させる方法に関する。

## 背景技術

現在、真核生物由来のタンパク質を組み換え体として大量調製するためには大腸菌を宿主とした発現システムが広く用いられている (Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7 494-499 (1996)、Baneyx, Curr. Opin. Biotechnol. 10 411-421 (1999))。大腸菌は中温菌で、18℃から 37℃で生育するが、組み換えタンパク質を発現させるための培養温度も上記温度範囲内でなければならない。しかし、真核生物由来のタンパク質がその活性を示すのもまた同じ温度範囲内であり、そのため、いくつかのタンパク質は組み換え体として大腸菌内で発現させると、大腸菌の生育を阻害してしまい、その結果、有意な量の組み換えタンパク質が得られないことがある。

大腸菌以外では Saccharomyces cerevisiae や Pichia pastoris (Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 (1999))、Sf9 細胞 (Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 (1993)) など真核細胞を宿主として用いた発現システムが知られているが、これらも培養温度が 30℃前後でないと組み換えタンパク

質を効率よく発現させることが出来ず、同様の理由からその調製が困難な場合がある。例えば、組み換えタンパク質の産生に通常用いられている昆虫細胞 Sf9 を用いて外来タンパク質の産生を行う場合、その産生のための至適温度は約 28℃ であり、最低温度は約 18℃ である (Agathos et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 589 372-398 (1990)、Faber et al., Yeast 11 1331-1344 (1995))。また、酵母 (*Pichia pastoris*) を用いて外来タンパク質の産生を行う場合、その産生のための至適温度は約 30℃ であり、最低温度は約 15℃ である (Brock et al., J. Membr. Biol. 180 147-161 (2001)、Sarramegna et al., Protein Expr. Purif. 24 212-220 (2002))。すなわち、昆虫細胞 Sf9 の好適生育温度範囲は約 18℃ 以上であり、酵母の好適生育温度範囲は約 15℃ 以上である。またこれらを宿主とした場合、いくつかのタンパク質は糖鎖などの修飾を受けてしまい、その後の立体構造解析などの機能解析に不都合なことがある。

#### 発明の開示

本発明は、大腸菌をはじめとする他の組み換えタンパク質発現システムで発現させることが出来ないタンパク質を発現させることを目的とする。例えば、15℃ を超える中高温条件下で大腸菌等の形質転換宿主細胞中で発現させることができないタンパク質を低温で発現させることを目的とする。

また、本発明は、*Rhodococcus* 属細菌を用いて外来の組み換えタンパク質を誘導発現させることを目的とする。

上記問題を解決するためには、組み換えタンパク質の活性を抑制するために、低温で発現させることが有効だと考えられる。大腸菌においては、低温誘導性プロモーターを用いた 15～16℃ での発現システムが、最も低い温度で組み換えタンパク質を産生させた例である (特表平 10-503090、Mujacic et al., Gene 238 325-332 (1999))。また、上述のように昆虫細胞や酵母でも 15℃～18℃ での組み換えタンパク質の産生が従来知られていた最も低い温度での組み換えタンパク質の産生である。従って、従来の公知の宿主細胞を用いての組み換えタンパク質を発現させ得る最低温度である 15℃～18℃ 以下、好ましくは 4℃ 前後で発現させることが有効であると考えられた。しかし、15℃ 以下、特に 4℃ 前後では上述の宿主細胞はいずれも生育が困難であり、タンパク質の産生も不可能であるため、約

15℃以下の低温、特に 4℃前後でも生育できる細菌を宿主とした発現システムを用いれば良いと考えられる。そこで、本発明者らは、Rhodococcus 属細菌を宿主とした、広範な温度域 (4℃から 32℃前後) において、外来蛋白質を発現せしめる誘導型発現ベクターを構築することによって、かかる問題を解決しようとした。

Rhodococcus erythropolis (Larkin et al., Antonie van Leeuwenhoek 74 133-153 (1998)) は 4℃から 35℃までの広範な温度域で生育する放線菌で、同菌と大腸菌との両細胞種で自律複製可能な複合ベクター (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 (1997)) も開発されており遺伝子工学の研究も容易である。

また Rhodococcus 属細菌全般でも、大腸菌との複合ベクターが開発されており (特開平 5-64589、特開平 8-56669)、外来遺伝子を構成的に発現せしめる汎用的発現ベクターも存在する (特開平 10-248578)。

しかし、効率よく迅速に低温でタンパク質を発現させるためには、容易に、厳密に、強力にタンパク質の発現調節が出来る誘導型発現ベクターの開発が不可欠である。すなわち、まず発現を抑制した状態で、30℃において細胞を増殖させ、その後温度を例えば 4℃に下げて発現を誘導するのである。しかし、これまでに同菌においてそのような誘導型発現ベクターの報告がなく、他種の細菌由来の発現誘導システムを流用することが有効だと考えられた。

Streptomyces coelicolor は Rhodococcus erythropolis と同じく放線菌の一種で、同菌では抗生物質チオストレプトンの添加によって発現が誘導される一連の遺伝子群が知られていた (Murakami et al., J. Bacteriol. 171 1459-1466 (1989))。そのうちの一つ TipA 遺伝子は 253 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、この TipA タンパク質はチオストレプトンと共有結合し、自身のプロモーター領域に TipA-チオストレプトン複合体として作用し、自身の構造遺伝子からの転写を強力に促進することが知られていた (Holmes et al., EMBO J. 12 3183-3191 (1993)、Chiu et al., Biochemistry 35 2332-2341 (1996))。また、この TipA 遺伝子プロモーターと TipA 構造遺伝子を用いた誘導型発現ベクターも開発されており、Streptomyces 属内で外来タンパク質を発現させた例がある (Enguita et al., FEMS Microbiol. Lett. 137 135-140 (1996))。Rhodococcus erythropolis においても、TipA 構造遺伝子、並びに TipA 遺伝子プロモーターの下流に標的タンパク質の構造遺伝子を連結した遺伝子群を導入したベクターを構築すれば、この



Streptomyces 属細菌同様に、誘導型発現ベクターになりうると考えられるが、その報告はなかった。

また、約 15℃以下の低温、特に 4℃で組み換えタンパク質を生産可能になれば、宿主の増殖を阻害するタンパク質を生産させるだけでなく、以下に述べるような利点もあると考えられる。

大腸菌で組み換えタンパク質を 37℃で発現させると、封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作る場合がある。しかし、同一のタンパク質でも発現時の温度を 30℃以下にすると活性のある可溶性のタンパク質が生産される例が多数知られている (Schein and Noteborn, *Bio/Technology* 6 291-294 (1988)、Piatak et al., *J. Biol. Chem.* 263 4837-4843 (1988)、Schirano and Shibata, *FEBS Lett.* 271 128-130 (1990)、Vasnia and Baneyx, *Protein Expr. Purif.* 9 211-218 (1997)、Lin et al., *Protein Expr. Purif.* 1 169-176 (1990))。従って、約 15℃以下の低温、特に 4℃前後での発現システムが構築されればこの可溶化の問題も解決されと考えられる。

さらに、好適生育温度範囲が 20℃以下の細菌である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質も約 15℃以下の低温、特に 4℃前後での生産が好ましいと考えられる。これは、これらのタンパク質は温度が高い場合、活性のあるタンパク質として発現されないことがあると考えられるからである。これに関しては、好冷菌由来の  $\alpha$ -amylase を好冷菌を宿主として発現させた例が唯一存在するものの (Tutino et al., *Extremophiles* 5 257-264 (2001))、発現誘導型のベクターではなく、迅速に大量生産させるのは困難だと考えられる。

そこで本発明者らは、Rhodococcus 属細菌中で外来タンパク質を誘導発現し得る発現ベクターおよび約 15℃以下の低温で外来タンパク質を誘導発現し得る発現ベクターの構築について鋭意検討を行い本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- (1) 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、該宿主以外の宿主の好適生育温度範囲以下の温度で発現し得る発現ベクター。
- (2) 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター

であって、15℃以下の温度で発現し得る発現ベクター。

(3) 4℃で発現し得る(1)または(2)の発現ベクター。

(4) 宿主細胞が Rhodococcus 属細菌である、(1)から(3)のいずれかの発現ベクター。

(5) Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、(4)の発現ベクター。

(6) 誘導物質がチオストレプトンである、(1)から(5)のいずれかの発現ベクター。

(7) 外来遺伝子が、15℃を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする、(1)から(6)のいずれかの発現ベクター。

(8) 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む(1)から(7)のいずれかの発現ベクター。

(9) (1)から(8)のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体。

(10) (1)から(8)のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

(11) 宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、該宿主細胞の好適生育温度範囲より低い好適生育温度範囲を有する他の宿主細胞中で誘導物質により誘導発現し得る誘導型発現ベクター。

(12) 4℃で発現し得る(11)の発現ベクター。

(13) 宿主細胞が Rhodococcus 属細菌である、(11)または(12)の発現ベクター。

(14) Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、(13)の発現ベクター。

(15) 誘導物質がチオストレプトンである、(11)から(14)のいずれかの発現ベクター。

(16) 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む(11)から(15)のいずれかの発現ベクター。

- (17) (11) から (16) のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体。
- (18) (11) から (16) のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。
- (19) Rhodococcus 属細菌中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター。
- (20) Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、(19) の発現ベクター。
- (21) 誘導物質がチオストレプトンである、(19) または (20) の発現ベクター。
- (22) TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、(19) から (21) のいずれかの発現ベクター。
- (23) (19) から (22) のいずれかの発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。
- (24) (19) から (22) のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。
- (25) 15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。
- (26) TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、外来遺伝子を低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌内で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。
- (27) さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域を含み、大腸菌中で複製可能な (26) の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。
- (28) TipA 遺伝子プロモーターが TipA-LG10 プロモーターである (26) ま

たは (27) の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

(29) 配列番号 106 に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号 107 に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号 108 に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号 109 に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号 110 に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号 111 に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号 112 に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号 113 に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1 および pTip-LCH2.1 からなる群から選択される (26) から (28) のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

(30) Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、(25) から (29) のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

(31) (25) から (30) のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。

(32) 外来遺伝子として 15℃ を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をコードする遺伝子を含む (25) から (30) のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、15℃ を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質を低温で産生させる方法。

(33) 15℃ を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃ を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(32) のタンパク質を低温で産生させる方法。

(34) 15℃ を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で 15℃ を超える中高温で発現させた場合に不活性な封入体を作るタンパク質である、(32) のタンパク質を低温で産生させる方法。

(35) 好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質をコードする遺伝子を含む (25) から (30) のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導

型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質を低温で産生させる方法。

(36) 外来遺伝子を含む(25)から(30)のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、15℃を超える中高温条件下および低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養し、15℃以下の低温条件下でのみ発現される遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(37) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(36)の15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(38) 大腸菌に導入し15℃を超える中高温で発現させよとした場合に、発現しないかまたは大腸菌の増殖を阻害する遺伝子を選択し、次いで該遺伝子を外来遺伝子として含む(25)から(30)のいずれかの Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養したときに発現しうる遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(39) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌の増殖を30℃以上で阻害するタンパク質である、(38)のタンパク質をスクリーニングする方法。

(40) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15℃を超える中高温で発現させた場合に封入体を作るタンパク質である、(38)のタンパク質をスクリーニングする方法。

(41) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(38)の15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(42) (36)から(41)のいずれかのスクリーニングする方法により得

られた 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. 本発明の発現ベクターの構築

本発明の発現ベクターは、低温で増殖可能な細胞中で自律複製可能で、該ベクター中に組込まれた外来遺伝子を誘導的に発現し得るベクター、すなわち誘導型発現ベクターである。

低温で増殖可能な細胞は限定されず、低温で増殖できる細胞ならば大腸菌、酵母等のいずれの微生物、昆虫細胞、哺乳類細胞等も使用しうる。確実に低温で増殖し得るという点で Rhodococcus 属に属する細菌、好ましくは R. erythropolis、R. fascians、R. opacus 等が挙げられる。これら 3 種類の Rhodococcus 属細菌のうち、R. erythropolis が 4℃での増殖速度が最も大きく他の 2 種はそれよりも劣る。しかし、本発明のベクターを用いたタンパク質の産生においては、細胞を増殖に適した温度で増殖させた後に、該細胞を低温に移して誘導的に発現させタンパク質を産生させ得る。従って、4℃で組み換え外来タンパク質を発現産生可能な限り増殖速度は問題とならず、R. erythropolis、R. fascians、R. opacus の 3 種の Rhodococcus 属に属する種すべてを好適に用い得る。

低温とは、通常細菌の至適増殖温度よりも低い温度をいい、4℃から 18℃、好ましくは 4℃から 15℃、特に好ましくは 4℃前後の温度をいう。通常細菌の好適生育温度範囲は細菌の種類によっても異なるが約 15℃から約 40℃または約 18℃から約 40℃であり、本明細書においては約 15℃を超える温度を中高温という。

外来遺伝子とは、本発明のベクターを用いて発現産生させようとする標的タンパク質をコードする遺伝子であり、宿主細胞以外の生物由来のタンパク質をコードする遺伝子をいう。本発明のベクターに組込む外来遺伝子は、約 15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質をコードする遺伝子である。約 15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質とは約 15℃を超える中高温で発現させようとしても、発現効率が低いか全く発現しないタンパク質をいう。このようなタンパク質として宿主細胞の至適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその微生物の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主微生物の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該

宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が 20℃ 以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質等をコードする遺伝子が挙げられる。

ある遺伝子を大腸菌に基づく発現系で約 15℃ を超える中高温で発現させようとしたとき、または該遺伝子を本発明の発現ベクターに含ませ Rhodococcus 属細菌で約 15℃ を超える中高温で発現させようとしたときに、発現しないかまたは発現量が外来遺伝子を本発明の発現ベクターに含ませ Rhodococcus 属細菌で低温で発現させたときの発現量より有意に低い場合に、該タンパク質は約 15℃ を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質であるといえる。

例えば、通常組み換えタンパク質の発現産生によく用いられる大腸菌を用いて発現させようとした場合に、大腸菌の好適生育温度範囲である 18℃ から 37℃ で発現できないか、大腸菌に致死性的となるか、大腸菌の増殖を阻害するか、大腸菌内で凝集し不活性な封入体を作るタンパク質をコードする遺伝子を、Rhodococcus erythropolis に導入して Rhodococcus erythropolis を 4℃ から 18℃ の低温で増殖させることにより前記タンパク質を効率的に大量に産生させることができる。また、Rhodococcus erythropolis を用いて約 15℃ を超える温度で発現させようとした場合に、発現できないか、Rhodococcus erythropolis に致死性的となるか、Rhodococcus erythropolis の増殖を阻害するようなタンパク質を、Rhodococcus erythropolis を用いて 4℃ から 15℃ の低温で増殖させても前記タンパク質を効率的に大量に産生させることができる。

約 15℃ を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質の種類

は限定されないが、例えば後述の実施例に記載のタンパク質を例示することができる。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、後述のプロモーターの下流にマルチクローニング部位を含ませおきその部位にコードする遺伝子を組込めばよい。

外来遺伝子を誘導的に発現し得るベクターとは、一定の処理を施すことにより組込まれた外来遺伝子の発現が誘導されるベクターをいう。例えば、特定の調節物質で発現を誘導し得るプロモーターをベクターに組込むことにより誘導型発現ベクターを構築することが可能である。このようなプロモーターとして宿主細胞の培養培地中に誘導物質である薬剤を導入することにより特異的に誘導するプロモーターがあり、例えばチオストレプトン誘導性プロモーターである TipA 遺伝子プロモーターが挙げられる。このような誘導性プロモーターを組込んだベクターを導入した宿主細胞を 15℃ から 18℃ 以上の細胞の増殖に適した温度で十分増殖させた後に、タンパク質の発現を誘導する薬剤を添加することにより目的のタンパク質を大量に発現させることができる。さらに、TipA タンパク質をコードする TipA 遺伝子、TipA 遺伝子の発現を誘導する ThcA 遺伝子プロモーター等の適当なプロモーターを組込めばよい。宿主細胞が Rhodococcus 属に属する細菌である場合、該細菌はチオストレプトンに対して感受性であるため、チオストレプトンに対しての耐性を付与するチオストレプトン耐性遺伝子等を組込む。

また、本発明の発現ベクターは、薬剤耐性遺伝子を含んでいてもよい。

さらに、複数の宿主細胞に適合させるために複合ベクター（シャトルベクター）であってもよい。例えば、大腸菌および Rhodococcus 属に属する細菌のいずれにも導入可能でこれらの宿主細胞中で外来遺伝子を発現しうるベクターが挙げられる。このようなベクターを構築する場合、それぞれの宿主細胞でプラスミドの自律複製に必須な DNA 領域を組込んでおく必要がある。例えば、大腸菌と Rhodococcus 属に属する細菌に適した複合ベクターの場合、大腸菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域として ColEI 配列を、Rhodococcus 属に属する細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域として RepA および RepB 遺伝子を組込めばよい。このような複合ベクターは大腸菌を用いて大量に複製することが可能である。

本発明の発現ベクターは、少なくとも第 1 のプロモーター活性を有する DNA 配



列、外来遺伝子を組込むための第1のマルチクローニング部位を含む。さらに、第1のプラスミドの自律複製に必須なDNA領域、第1の薬剤耐性遺伝子、第1のマルチクローニング部位に連結された外来遺伝子、第1の転写終結配列を含む。第1のプロモーター活性を有するDNA配列としてTipA遺伝子プロモーターが挙げられ、TipA遺伝子プロモーターを含む場合、TipA遺伝子、およびTipA遺伝子を発現させるためのThcA遺伝子プロモーター等の第2のプロモーター配列、TipA遺伝子下流の第2の転写終結配列を含む。TipA遺伝子プロモーターはTipA-LG10プロモーター等のその配列を改変させたものでもよい。さらに、TipA遺伝子プロモーター誘導発現系を含む場合であって、宿主細胞がRhodococcus属細菌である場合には、Rhodococcus属細菌にチオストレプトンに対する耐性を付与するためにチオストレプトン耐性遺伝子を含んでいる必要がある。

プロモーター活性を有するDNA配列、外来遺伝子および転写終結配列は発現カセット (Expression cassette) を構成し、TipA遺伝子およびTipA遺伝子発現用プロモーターは誘導カセット (Inducer cassette) を構成する。

本発明のRhodococcus属細菌用発現ベクターは、タンパク質自体が15℃を超える中高温で発現可能なものならば低温ばかりでなく15℃を超える中高温においても該タンパク質を発現させ得る。

本発明の発現ベクターとして、図9に記載のpTipベクターが挙げられ、マルチクローニング部位の構造により図9aに示すようにpTip-NH1、pTip-NH2、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LNH1、pTip-LNH2、pTip-LCH1およびpTip-LCH2、がある。pTip-NH1、pTip-NH2、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LNH1、pTip-LNH2、pTip-LCH1およびpTip-LCH2ベクターの配列はそれぞれ、配列番号106～113に示される。

さらに、本発明の発現ベクターとして、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2において、マルチクローニング部位のXhoI部位以降の読み枠を市販のpETベクター (Novagen 社) の読み枠と一致させるために BglII と XhoI 部位を分けた pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1がある。

本発明のベクターは、後述の実施例の記載および図1から図8のベクター構築図に従えば容易に構築することができる。

## 2. 本発明のベクターの使用

本発明の発現ベクターを用いて、約15℃を超える中高温で発現させることが困

難であるかまたは不可能なタンパク質を産生させることができる。このようなタンパク質として、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が 20℃ 以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質が挙げられる。

これらのタンパク質をコードする遺伝子を本発明の発現ベクターのマルチクローニング部位に適当な制限酵素を用いて組込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、宿主細胞を低温条件下で培養することにより前記タンパク質を発現させることができる。宿主細胞は、低温で増殖し得る細胞である必要があり、Rhodococcus 属に属する細菌、好ましくは R. erythropolis、R. fascians、R. opacus 等が挙げられる。これらの細胞は低温で増殖可能であるが、増殖に好適な温度は 15℃ 以上、さらに好適な温度は 18℃ 以上、特に好適な温度は約 30℃ 前後であり、遺伝子を組込んだタンパク質を発現させる前に、増殖に適した温度で十分増殖させたのちに、低温条件下に移しベクター中に含まれる誘導型プロモーターの機能を利用して適当な薬剤を用いてタンパク質を発現させることができる。

本発明のベクターが、TipA 遺伝子プロモーターを含む場合、チオストレプトンを培地に添加することによりタンパク質の発現が誘導される。この際チオストレプトンは、終濃度 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以上、好ましくは 1  $\mu\text{g/ml}$  以上となるように添加すればよい。ただし、10  $\mu\text{g/ml}$  を越えると生育が悪くなる。

本発明のベクターを用いて、約 15℃ を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質をスクリーニングすることができる。このよう

なタンパク質として、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質が挙げられる。

例えば、適当な動物種の適当な組織から poly (A)<sup>+</sup>RNA を抽出し、cDNA を合成し、発現ベクターに組込む。次いで、該ベクターを用いて大腸菌等の宿主細胞を形質転換し、発現ライブラリーを構築し、30℃で増殖発現させた場合に、増殖が阻害されるクローンから組込まれた遺伝子を単離することにより、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質または宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質をコードする遺伝子を選択する。この際、発現ベクターに適当な薬剤で誘導されるプロモーターを組込んでおき薬剤で発現を誘導した場合に宿主細胞の増殖が阻害され、誘導しない場合には宿主細胞が増殖するようなクローンを選択すればよい。次いで、単離した遺伝子を本発明の発現ベクターに組込んで、該組み換え発現ベクターで Rhodococcus erythropolis を形質転換し、4℃から 15℃の低温で増殖発現させ、増殖が阻害されことなく前記遺伝子を発現するクローンを選択することにより、上記タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。また、cDNA ライブラリーの遺伝子を本発明の発現ベクターに組込んで、該組み換え発現ベクターで Rhodococcus erythropolis を形質転換し、低温

または約 15℃を超える中高温で培養し、増殖が阻害されることなく組込んだ遺伝子を発現するクローンを選択するか、または発現誘導させたときに発現される遺伝子を組込んだクローンを選択することにより上記タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。

前記スクリーニングにより得られた約 15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質も本発明に包含される。このようなタンパク質として、後述の実施例に記載されたタンパク質が例示できる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-235008 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、誘導型発現ベクターのバックボーンになるプラスミド pHN136 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。

図 2 は、チオストレプトン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN143 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

図 3 は、Inducer cassette を持つプラスミド pHN62 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

図 4 は、Expression cassette を持つプラスミド pHN153 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAP は（Calf Intestine Alkaline Phosphatase を Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

図 5 は、テトラサイクリン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN169 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

図 6 は、PIP をレポーター遺伝子として持つ誘導型発現ベクタープラスミド

pHN170、pHN171 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースペアー:kb）を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を意味する。図 6 において一連の工程を 2 つに分けて示してあるが、工程の順序が明確になるように両者には重複部分がある。

図 7 は、マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペアー:kb）を示す。図 7 において一連の工程を 2 つに分けて示してあるが、工程の順序が明確になるように両者には重複部分がある。

図 8 は、マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペアー:kb）を示す。図 8 において一連の工程を 2 つに分けて示してあるが、工程の順序が明確になるように両者には重複部分がある。

図 9 a は、a) pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LNH1、pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 のマップを示す図である。各領域の機能と、プラスミドのマップを示す。

図 9 b は、b) pTip-NH1、pTip-LNH1 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 c は、c) pTip-CH1、pTip-LCH1 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 d は、d) pTip-NH2、pTip-LNH2 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 e は、e) pTip-CH2、pTip-LCH2 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 10 は、pTip-CH1.1、pTip-LCH1.1、pTip-CH2.1 および pTip-LCH2.1 のマッ

プを示す図である。

図 1 1 は、PIP 活性測定のためのコントロールプラスミド pHN172、pHN173 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。また、CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を意味する。pHN170 は、「Expression cassette」と「Inducer cassette」両方をもつものに対して、pHN173 は「Expression cassette」のみをもち、pHN172 は両 cassette を持たない。

図 1 2 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 1 の結果を示す図である。

図 1 3 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 2 a の結果を示す図である。

図 1 4 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 2 b を示す図である。

図 1 5 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 3 の結果を示す図である。

図 1 6 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 1 の結果を示す写真である。

図 1 7 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 2 の結果を示す写真である。

図 1 8 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 3 a の結果を示す写真である。

図 1 9 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 3 b の結果を示す図である。

図 2 0 は、大腸菌の増殖を 30℃ で阻害するタンパク質のリストを示す図である。

図 2 1 は、Rhodococcus erythropolis、大腸菌を宿主とした外来タンパク質の発現を示す図である。

図 2 2 は、TipA 遺伝子プロモーター配列を示す図である。

図 2 3 は、TipA 遺伝子プロモーター中の RBS 配列（WT RBS）の LG10 RBS への改良を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例 1〕

Rhodococcus erythropolis 由来の、Rhodococcus 属細菌内で自律複製可能なプラスミドの分離とその一部 DNA 配列の決定

Rhodococcus erythropolis と大腸菌の複合ベクターを作成するために、まず Rhodococcus 属細菌内に存在する小型の内在性プラスミドを検索した。すると、Rhodococcus erythropolis JCM2895 株にその存在が確認された。このプラスミドに pRE2895 と名前を付けた。以下にプラスミドの分離と、その DNA 配列決定について具体的に述べる。

Rhodococcus erythropolis JCM2895 株を 5ml の LB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone, 0.5% Difco Yeast Extract, 1.0% 塩化ナトリウム) にて、30℃で 30 時間培養した菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製) を用いて pRE2895 を精製した。この際、Buffer P1 250  $\mu$ l に懸濁後、Buffer P2 250  $\mu$ l を加える前に、5  $\mu$ l のリゾチーム (100mg/ml) を加え 37℃で 30 分インキュベートした点を除いては、使用説明書通りに作業した。

上記 DNA サンプルを制限酵素 EcoRI で処理し、1.0%アガロースゲル電気泳動 (100V、30 分) に供したところ、約 5.4kb の DNA 断片 1 本の存在が確認された。

この約 5.4kb の DNA 断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、使用説明書通りに精製した。得られた EcoRI 断片を常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従って、プラスミド pBluescript II SK (+) (STRATAGENE 社製) の EcoRI 部位にサブクローンし、このプラスミドに pHN79 と名前を付けた。

pHN79 を Reverse、M13-20 両プライマー (共に STRATAGENE 社製) を用い、DNA シークエンサー ABI PRISM (R) 3100 Genetic Analyzer (ABI 社製) を用いて、使用説明書に準じて、pHN79 の塩基配列を約 400 塩基ずつそれぞれ決定した。相同性検索の結果、pHN79 にサブクローンされた Rhodococcus erythropolis JCM2895 株由来の DNA 領域はその 99.8%の配列が GenBank に受入番号 AF312210 として登録されている 5403 塩基対の環状 DNA、pN30 と一致した。

分離した pRE2895 は全塩基配列を決定しなかったが、pN30 との相同性は極めて高く、また制限酵素切断地図も pN30 の配列から予想されるものと一致したことから、これらの相同性はプラスミド全体にわたっていると予想された。また、pN30 は Mycobacterium fortuitum 002 株から分離された内在性プラスミド pAL5000 (Rauzer et al., Gene 71 315-321 (1988), Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 (1996)), Rhodococcus erythropolis NI86/21 株から分離された pFAJ2600 (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 (1997)) と相同性が高く、類似の機構で自律複製していると考えられた。pAL5000 は推定 RepA 遺伝子、推定 RepB 遺伝子、推定複製開始点を含む領域のみで各細菌内で自律複製するために十分であるため、本発明者らが分離した pRE2895 も同様の領域のみを発現ベクター中に組み込めば、Rhodococcus 属細菌内で自律複製するために十分と考えられた。

#### 〔実施例 2〕

##### ベクタープラスミド pHN136 の構築

実施例 1 で分離した pRE2895 の一部と大腸菌内で自律複製可能なプラスミドの一部を用いて両菌の複合ベクターを作成するため以下の作業を行った (図 1)。

プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 1、2 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー (以下プライマーと略記) を用いて、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (以下、PCR と略記: Saiki et al., Science, 239 487-491 (1988)) による DNA の増幅を行った。なお、用いた PCR 用の酵素は Pfu turbo (STRATAGENE 社製) である。その結果、アンピシリン耐性遺伝子 (図中においては Amp<sup>r</sup> と表記) と大腸菌内で自律複製させるために必要な ColE1 配列領域を含む 2.0kb の増幅された DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 SacI と BsrGI で二重消化し、1.0% アガロースゲル電気泳動 (100V、30 分) に供し、該 DNA 断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて、使用説明書に準じて精製した。

一方、pN30 (実施例 1) の配列をもとに Rhodococcus 属細菌内で自律複製するために必要と思われる領域を増幅するプライマーを設計した。なお、同プライマーの配列は配列表中の配列番号 3、4 で示される。プラスミド pHN79 をテンプレートとして、両プライマーを用いて PCR による増幅を行ったところ 1.9kb の増幅



された DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 BsrGI と SacI で二重消化し、1.0% アガロースゲル電気泳動 (100V、30 分) に供し、該 DNA 断片を切り出し、上述の方法と同様に精製した。

上記 2 つの精製された DNA 断片を DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造社製) を用いて、使用説明書通りにライゲーションし、得られたプラスミドに pHN129 と名前を付けた。

次に pHN129 に存在する制限酵素認識部位 BamHI、SalI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、pHN129 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 5、6 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。この PCR 断片を BglII と PstI で二重消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を pHN129 の BamHI、PstI 部位にサブクローンした。結果、BglII と BamHI で連結された部分においては推定 RepA 遺伝子のオープンリーディングフレーム (以下 ORF と略記) 内であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI 認識部位が除去された。また SalI 認識部位は BamHI 認識部位のごく近傍に存在したが、配列番号 5 に記載のプライマー中において、SalI 認識部位が除かれ、かつ、コードされるアミノ酸が置換されないよう設計されていることから、BamHI 認識部位と同時に SalI 認識部位も除去されている。このプラスミドに pHN135 と名前を付けた。

次に pHN135 に存在する制限酵素認識部位 BglII を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN135 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 5、6 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。この PCR 断片を PstI と BamHI で二重消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を pHN135 の PstI、BglII 部位にサブクローンした。結果、BamHI と BglII で連結された部分においては推定 RepB 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BglII 認識部位が除去された。この結果得られたプラスミドに pHN136 と名前をつけた。

### 〔実施例 3〕

#### ベクタープラスミド pHN143 の構築

タンパク質の発現誘導には抗生物質チオストレプトンを用いるが、Rhodococcus erythropolis は同物質に対して感受性であるために、耐性を付与させなければならない。そこで Streptomyces azureus が持つチオストレプトン耐性遺伝子、tsr

遺伝子 (Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 (1985) : 図中においては、Thio<sup>1</sup>と表記する) を複合ベクター中に組み込むこととした。なお、この遺伝子が Rhodococcus erythropolis 内で機能し、チオストレプトン耐性を付与することはすでに報告されている (Shao and Behki, Lett. Appl. Microbiol. 21 261-266 (1995))。以下に、同遺伝子の分離について具体的に述べる (図 2)。

まず、PCR のテンプレートに使用する Streptomyces azureus JCM4217 株のゲノム DNA を以下のように調製した。5ml の SB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% Glucose、5mM 塩化マグネシウム、0.5% グリシン) にて 30℃ で培養した同菌株を 500  $\mu$ l の SET バッファー (75mM 塩化ナトリウム、25mM EDTA (pH8.0)、20mM Tris-HCl (pH7.5)) に懸濁した。そこに、5  $\mu$ l のリゾチーム溶液 (100mg/ml) を加え、37℃ で 30 分インキュベートした。そして、14  $\mu$ l のプロテアーゼ K 溶液 (20mg/ml) と 60  $\mu$ l の硫酸ドデシルナトリウム溶液 (10%) を加え、よく混合した後 55℃ で 2 時間インキュベートした。その後、200  $\mu$ l の塩化ナトリウム溶液 (5M) と 500  $\mu$ l のクロロホルムを加え、20 分間室温で回転撹拌した。遠心分離し、700  $\mu$ l の上清をとった。これをイソプロパノール沈殿後、乾燥させ、50  $\mu$ l の TE 溶液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)) に溶解した。

上記のように精製した Streptomyces azureus JCM4217 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7、8 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、チオストレプトン耐性遺伝子を含む 1.1kb の増幅された DNA を得た。なおこの DNA 断片はプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼ (Gibco BRL 社製) を用いたため、その末端は平滑末端である。この DNA 断片を精製し、常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) に従い 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pGEM-3Zf (+) (Promega 社製) の HincII 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から HindIII 認識部位-tsr 遺伝子 ORF-EcoRI 認識部位である)。このプラスミドに pHN137 と名前を付けた。

次に pHN137 に存在する制限酵素認識部位 SalI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号

9、10に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端を HindIII で消化して得られた 0.6kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 11、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端を EcoRI で消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の HindIII, EcoRI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては tsr 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN143 と名前を付けた。

#### 〔実施例4〕

#### ベクタープラスミド pHN62 の構築

チオストレプトンによって誘導型発現をさせるためには Rhodococcus 属細菌内に TipA タンパク質を存在させなければならない。そのために、Rhodococcus erythropolis から構成的なプロモーターを分離し、その下流に TipA タンパク質をコードする構造遺伝子を連結した(図3)。構成的に機能するプロモーターとしては Rhodococcus erythropolis のアルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードする ThcA 遺伝子 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995)) のプロモーター配列を用いた。

テンプレートに使用する Streptomyces coelicolor A3(2) 株のゲノム DNA は Streptomyces azureus からゲノム DNA を調製したときと同様に作業し、精製した。また、Rhodococcus erythropolis JCM3201 株のゲノム DNA は 5ml の LB 培地で培養した点を除いては Streptomyces azureus からゲノム DNA を調製したときと同様に作業し、精製した。

上述のように精製した Streptomyces coelicolor A3(2) 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 13、14に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用

いた。その結果、TipA 遺伝子の ORF 並びにその下流の転写終結配列を含む DNA (図中においては TipA と表記) を得た。

この PCR 断片の片方の末端を BglIII で消化して得られた 0.9kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、上述のように精製した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 15、16 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、アルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードする ThcA 遺伝子 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995)) のプロモーター配列 (図中においては ALDHp と表記) を含む DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XbaI で消化して得られた 0.2kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI、BamHI 部位にサブクローンした結果、ThcA 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に TipA 遺伝子の ORF 並びに転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN33 と名前を付けた。

次に pHN33 に存在する制限酵素 NcoI 認識部位 2 カ所 (以下、NcoI (1)、NcoI (2) と表記する) を除去するため以下の作業をおこなった。

まず、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、17 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XbaI で消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 18、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を KpnI で消化して得られた 0.6kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI、KpnI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては TipA 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることな

く、NcoI (1) 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN50 と名前を付けた。

次に pHN33 に存在する制限酵素認識部位 NcoI (2) を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、19 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XbaI で消化して得られた 0.8kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 20、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を KpnI で消化して得られた 0.3kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI, KpnI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては TipA 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、NcoI (2) 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN51 と名前を付けた。

最後に以下の作業を行った。pHN50 を XbaI と SacI で二重消化して得られた 0.7kb の DNA 断片と pHN51 を SacI と KpnI で二重消化した 0.4kb の断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI, KpnI 部位にサブクローンした。結果、NcoI (1) と NcoI (2) 両方の制限酵素部位を欠いた TipA 遺伝子を持つプラスミドを取得し、これに pHN62 と名前をつけた。

#### 〔実施例 5〕

#### ベクタープラスミド pHN153 の構築

目的のタンパク質を誘導的に発現せしめることができるかどうか確認するために、TipA 遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子として Thermoplasma acidophilum 由来のプロリンイミノペプチダーゼ (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996) : 以下 PIP と略記する) をコードする遺伝子の ORF (図中においては PIP ORF と表記) を連結し、さらにその下流に転写のリードスルーを抑制するために転写終結配列を連結した。以下に具体的に述べる (図 4)。

実施例 4 にて精製した Streptomyces coelicolor A3 (2) 株のゲノム DNA をテン

プレートとして、配列表中の配列番号 2 1、2 2 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子のプロモーター配列（図中においては TipAp と表記）を含む 0.2kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の SmaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から KpnI 認識部位-TipA 遺伝子プロモーター配列-SacI 認識部位である）。このプラスミドに pHN150u と名前を付けた。

次に、プラスミド pRSET-PIP (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996) : 以下 PIP と略記する) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 2 3, 2 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なお、配列表中の配列番号 2 4 のプライマーは PIP 遺伝子の終止コドンを除いて、かつタンパク質の精製を容易にするために 6×His タグが PIP タンパク質の C 末端に付くように設計されている。6×His タグは、6 つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる (Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 (1994))。この PIP 遺伝子を含む 0.9kb の DNA 断片を制限酵素 NcoI と SpeI で二重消化し、pHN150u の NcoI、SpeI 部位にサブクローンした結果、TipA 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に PIP 遺伝子の ORF を含むプラスミドが作成され、pHN151u と名前を付けた。

次に、実施例 4 にて精製した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 2 5, 2 6 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、ThcA 遺伝子の転写終結配列 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995) : 図中においては ALDHt と表記) を含む DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 SpeI と XbaI で二重消化し、pHN151u の SpeI、XbaI 部位にサブクローンした。その結果、TipA 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に PIP 遺伝子の ORF を含み、またそのすぐ下流に ThcA 遺伝子の転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN153 と名前を付けた。

〔実施例 6〕

## ベクタープラスミド pHN169 の構築

Rhodococcus erythropolis をプラスミドで形質転換するためには適当な形質転換マーカーが必要になる。そこで Rhodococcus 属細菌内で機能する強力なプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を連結し、使用することとした。プロモーターとしては、Streptomyces 属細菌由来の Elongation factor Tu をコードする Tuf1 遺伝子プロモーターを用いることとしたが、これは同プロモーターが強力に下流の遺伝子を転写せしめるとの報告があるからである (Wezel et al., Biochim. Biophys. Acta 1219 543-547 (1994))。また、薬剤耐性遺伝子は入手が容易なテトラサイクリン耐性遺伝子を用いた。以下に具体的に述べる (図 5)。

実施例 4 にて精製した Streptomyces coelicolor A3 (2) 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 27、28 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、Tuf1 遺伝子のプロモーター配列 (図中においては Tuf1p と表記) を含む 0.2kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の HincII 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から KpnI 認識部位-Tuf1 遺伝子プロモーター配列-EcoRI 認識部位である)。このプラスミドに pHN158 と名前を付けた。

次に、プラスミド pACYC184 (Rose, Nucleic Acids Res. 16 355 (1988)) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 29、30 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、テトラサイクリン耐性遺伝子 (図中においては Tet<sup>r</sup> と表記) を含む DNA を得た。この 1.3kb の DNA 断片を制限酵素 XhoI と SpeI で二重消化し、pHN158 の SalI、SpeI 部位にサブクローンした結果、Tuf1 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN159 と名前を付けた。

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 BamHI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表 31、32 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの DNA 断片は Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いたため、その末端は平滑末端である。この PCR 断片の片方の末端を XhoI で消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を精製し、さらに常

法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 3、3 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を NotI で消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の XhoI、NotI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI 部位が除去された。このプラスミドに pHN165 と名前を付けた。

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 SalI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 1、3 5 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XhoI で消化して得られた 0.8kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 6、3 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を NotI で消化して得られた 0.8kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の XhoI、NotI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN166 と名前を付けた。

最後に以下の作業を行った。pHN166 を SphI と SpeI で二重消化して得られた 0.9kb の DNA 断片を pHN165 の SphI、SpeI 部位にサブクローンした。結果、BamHI と SalI 両方の制限酵素認識部位を欠くテトラサイクリン耐性遺伝子クローンを取得し、このプラスミドに pHN169 と名前をつけた。

〔実施例 7〕



ベクタープラスミド pHN170、pHN171 の構築

実施例 2 から 6 までに分離してきた遺伝子群を連結し、Rhodococcus 属細菌内で誘導可能な発現ベクターを構築するために以下の作業を行った (図 6)。

pHN143 を SacI で消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を pHN136 の SacI 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から推定 RepB 遺伝子 ORF-tsr 遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である)。その結果できたプラスミドに pHN144 と名前をつけた。

次に、pHN62 を XbaI と KpnI で二重消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を pHN144 の XbaI、KpnI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN152 と名前をつけた。

次に、pHN153 を BsrGI と XbaI で二重消化して得られた 1.2kb の DNA 断片を pHN152 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN154 と名前をつけた。

次に、pHN169 を XbaI と SpeI で二重消化して得られた 1.6kb の DNA 断片を pHN154 の XbaI 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から tsr 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-ThcA 遺伝子プロモーター配列である)。その結果 TipA 遺伝子プロモーターの制御下に置かれた PIP 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN170 と名前をつけた。

また組み換えタンパク質の高発現化のため、TipA 遺伝子プロモーター下流のリボソーム結合部位を翻訳効率の良いとされるラムダファージ gene10 由来の配列 (Gold and Stormo, Methods Enzymol. 185 89-93 (1990)) に変化させた (図 6)。以下に具体的に述べる。

プラスミド pHN170 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21, 37 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとラムダファージ gene10 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドプロモーター (以下 TipA-LG10 プロモーターと表記する: 図中に置いては TipA-LG10p と表記) を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と NcoI で二重消化し、pHN170 の BsrGI、NcoI 部位にサブクローンした。その結果 TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた PIP 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN171 と名前をつけた。図 22 に TipA プロモーター配列を、図

2 3 に TipA プロモーターの TipA-LG10 プロモーターへの改変のためのリボソーム結合部位 (RBS) 配列の改良を示す。

〔実施例 8〕

ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築

実施例 7 で述べたプラスミドからレポーターである PIP 遺伝子を除き、マルチクローニング部位を導入するため以下の作業を行った (図 7)。

配列表中の配列番号 3 8、3 9 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70℃で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。その結果、その末端は NcoI と SpeI で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA (図中においては MCS Linker NNco と表記) を pHN170 の NcoI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-NH1 と名前をつけた。また、配列表中の配列番号 4 0、4 1 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を同様に 2 本鎖化させた合成 DNA (図中においては MCS Linker CNco と表記) を pHN170 の NcoI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-CH1 と名前をつけた。

実施例 7 で述べた TipA 遺伝子プロモーター配列とラムダファージ gene10 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッド DNA を制限酵素 BsrGI と NcoI で二重消化し、pTip-NH1 と pTip-CH1 の BsrGI、NcoI 部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LNH1、pTip-LCH1 とそれぞれ名前を付けた。

〔実施例 9〕

ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築

実施例 8 で述べたプラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 において、マルチクローニング部位の最も上流の NcoI 部位を NdeI に変更するために以下の作業を行った (図 8)。

プラスミド pHN170 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 2 1、4 2 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターを含む DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と NdeI で二重消化し、pHN170 の BsrGI、NdeI 部位にサブクローンした。結果得られたプラス

ミドに pHN183 と名前を付けた。

配列表中の配列番号 43、44 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70℃で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。その結果、その末端は NdeI と SpeI で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA (図中においては MCS Linker NNde と表記) を pHN183 の NdeI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-NH2 と名前をつけた。また、配列表中の配列番号 45、46 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を同様に 2 本鎖化させた合成 DNA (図中においては MCS Linker CNde と表記) を pHN183 の NdeI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-CH2 と名前をつけた。

プラスミド pTip-LNH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、47 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとラムダファージ gene10 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッド DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と NdeI で二重消化し、pTip-NH2 と pTip-CH2 の BsrGI、NdeI 部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LNH2、pTip-LCH2 とそれぞれ名前を付けた。

実施例 8、9 で作成したプラスミドのマップと、マルチクローニング部位周辺の配列をまとめて図 9 に示す。該図中、実線の矢印は TipA 遺伝子プロモーター中に存在する Inverted repeat 配列を示す。斜線の矢印は ThcA 遺伝子転写終結配列に存在する Inverted repeat 配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な -10 領域、-35 領域、RBS は四角で囲んである。また RBS の中でも最も重要な SD 配列 (Shine and Dalgarno, Eur. J. Biochem. 57 221-230 (1975)) は下線を引いてある。図 9a 中のチオストレプトン誘導システムは、Thio<sup>r</sup>、ALDHp、TipA、TipAp、TipA-LG10p および ALDHt を含む。Thio<sup>r</sup> は、R. erythropolis にチオストレプトン耐性を付与する。また、ALDHp は TipA タンパク質を構成的に産生するプロモーターを示し、TipA は TipA タンパク質をコードする。また、TipAp は TipA プロモーターを示し、TipA-LG10p は改良 TipA プロモーターを示し、ALDHt は転写終結配列を示す。さらに、プラスミドの自律複製に

必須な領域として、ColE1 および RepA&B を含む。ColE1 は大腸菌用であり、RepA & B は R. erythropolis 用である。さらに、抗生物質耐性マーカーとして Tuf1p-Tet<sup>r</sup> および Amp<sup>r</sup> を含む。Tuf1p-Tet<sup>r</sup> は R. erythropolis 用形質転換マーカーであり、Amp<sup>r</sup> は大腸菌用形質転換マーカーである。

〔実施例 10〕

ベクタープラスミド pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1 の構築  
実施例 8 及び 9 で述べたプラスミド pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2  
において、マルチクローニング部位の XhoI 部位以降の読み枠を市販の pET ベクタ  
ー（Novagen 社）の読み枠と一致させるために以下の作業を行った（図 10）。

プラスミド pTip-CH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104  
に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子  
プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA 断  
片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサブ  
クローンした。結果得られたプラスミドに pTip-CH1.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-CH2 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104  
に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子  
プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA 断  
片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサブ  
クローンした。結果得られたプラスミドに pTip-CH2.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LCH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104  
に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA-LG10  
プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA  
断片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサ  
ブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LCH1.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LCH2 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104  
に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA-LG10  
プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA  
断片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサ  
ブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LCH2.1 と名前を付けた。

〔実施例 11〕

## ベクタープラスミド pHN172、pHN173 の構築

発現の誘導が厳密に調節されているかを調べるために以下のようなコントロール実験用プラスミドを作成した（図 1 1）。

pHN169 を XbaI と SpeI で二重消化して得られた 1.6kb の DNA 断片を pHN144 の XbaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から tsr 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である）。その結果できたプラスミドに pHN172 と名前をつけた。

次に、pHN153 を BsrGI と XbaI で二重消化して得られた 1.2kb の DNA 断片を pHN144 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN164 と名前をつけた。次いで、pHN169 を XbaI と SpeI で二重消化して得られた 1.6kb の DNA 断片を pHN164 の XbaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から tsr 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である）。その結果できたプラスミドに pHN173 と名前をつけた。

pHN170 は、TipA 遺伝子プロモーター、その下流に PIP ORF、さらにその下流に ThcA 遺伝子転写終結配列、の 3 因子が連結された遺伝子カセット（以下 Expression cassette と表記）と、ThcA 遺伝子プロモーター、その下流に TipA 遺伝子、の 2 因子が連結された遺伝子カセット（以下 Inducer cassette と表記）両方をもつ。pHN173 は Expression cassette のみをもち、pHN172 は両 cassette を持たない。

### 〔実施例 1 2〕

## Rhodococcus 属細菌の形質転換

Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を LB 培地 100ml にて対数増殖期に至るまで 30℃で振とう培養する。培養液を 30 分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収する。これに 100ml の氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収する。これに 100ml の氷冷 10%グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収する。この氷冷 10%グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返す。菌体を 5ml の氷冷 10%グリセリン溶液に懸濁する。400  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素で瞬間冷凍し、使用するまで -80℃ にて保存した。-80℃ から菌体を取り出し、氷上にて融解し、プラスミド pHN170、または pHN172、または pHN173 を 3  $\mu$ l (そ

れぞれ約 300ng) 加えた。この菌体と DNA の混合液をエレクトロポレーションキューベット (Bio-Rad 社:0.2cm ギャップキューベット) に移し、同社の遺伝子導入装置 ジーンパルサーII を用いて、電場強度 12.5kV/cm で、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス 25 $\mu$ F、外部抵抗 400 $\Omega$  にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体と DNA の混合液を 1ml の LB 培地に混合し、30℃ にて 4 時間培養した後集菌し、20 $\mu$ g/ml テトラサイクリン入り LB 寒天培地 (寒天は濃度 1.8%) に塗布し、30℃ にて 3 日培養し、それぞれの形質転換体を得た。

### 〔実施例 13〕

#### Rhodococcus 属細菌における PIP 活性の測定 1

構築された発現ベクターにはレポーター遺伝子として PIP 遺伝子が組み込まれており、チオストレプトンによる誘導性、誘導の強さなどを、PIP の酵素活性を測定することで、確認することができる。菌体中に存在する PIP の量は人工基質 H-Pro- $\beta$ NA (Bachem 社製) を加水分解する活性を調べることで容易に定量が可能である。

実施例 12 にて作成した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株の形質転換体を 8 $\mu$ g/ml のテトラサイクリンを含む LB 培地で 30℃ にて培養し、600nm の波長で測定したオプティカルデンシティー (O. D. 600) が 0.6 になった時点で、終濃度 1 $\mu$ g/ml になるようにチオストレプトン (溶媒はジメチルスルホキシド) を加え、PIP の発現を誘導させた。

16 時間後に培養液の一部を取り出し、8 $\mu$ g/ml のテトラサイクリンを含む LB 培地で 200 $\mu$ l にメスアップし、60℃ にて 1 分加温する。そこに PIP の基質として 2 $\mu$ l の H-Pro- $\beta$ NA (100mM:溶媒はジメチルスルホキシド) を加え 60℃ にて 20 分インキュベートする (PIP は 60℃ が至適温度)。PIP によって H-Pro- $\beta$ NA から加水分解されて遊離した  $\beta$ NA を観察するために、発色剤として 134 $\mu$ l の Fast Garnet GBC Salt 溶液 (和光純薬社製で濃度 0.5mg/ml : 1M 酢酸ナトリウムバッファー (pH4.2)、10% Triton X-100 が溶媒) を加える。PIP が発現していなければ上記混合液は黄色を呈するが、発現していれば赤色を呈する。また、呈色した赤色を吸光分光光度計を用い、550nm での吸光度 (A550) を測定し、PIP 活性を定量した。測定は FastGarnet GBC Salt を加えた後、滅菌水 666 $\mu$ l を加え希釈して行った。

その際、550nm では細胞のオプティカルデンシティーも測定してしまうので、550nm での細胞のオプティカルデンシティー (O. D. 550) は別測定し、測定時に使用した O. D. 550 に相当する値を A550 の値から差し引いて補正した値を Ac550 とする。すなわち、 $Ac550 = A550 - O. D. 550 \times PIP$  の活性測定に使用した培養液量 (ml) で計算される。ユニット値は「20 分間の測定で得られる、培養液 1ml あたり、O. D. 600=1 あたりの Ac550 の値」とし、「 $Ac550 \div PIP$  の活性測定に使った培養液量 (ml)  $\div$  O. D. 600」で計算した。

pHN170 で形質転換した細胞において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。pHN172、pHN173 で形質転換した細胞においては、チオストレプトンの有無に関わらず、黄色を呈した。

実施例 1 2 にて作成した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株の形質転換体を  $8 \mu\text{g/ml}$  のテトラサイクリンを含む LB 培地で  $30^\circ\text{C}$  にて培養し、O. D. 600 が 2.0 になったら、直ちに  $4^\circ\text{C}$  に温度を下げ、菌体を馴化させるために、1 時間振とう培養した。そこに終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  になるようにチオストレプトンを加え、PIP の発現を誘導させた。40 時間後に培養液の一部を取り出し、上記  $30^\circ\text{C}$  と同様の実験を行った。

pHN170 で形質転換した細胞において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。pHN172、pHN173 で形質転換した細胞においては、チオストレプトンの有無に関わらず、黄色を呈した。

以上の結果をまとめて図 1 2 に示す。

図 1 2 に示すように Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170、pHN172、pHN173 で形質転換し、 $30^\circ\text{C}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で PIP を発現させた時と発現させない時、それぞれの PIP 活性を測定した。図 1 2 には終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  のチオストレプトンを加えたか否か (+または-)、活性値、培養温度、活性測定に使用した培養液量、形質転換したプラスミド、プラスミドの持つ「Cassette」の有無 (+または-) が示されている。

この結果から、広範な温度域において、チオストレプトンによって誘導可能な発現ベクターが構築されたことが確認された。

〔実施例 1 4〕

Rhodococcus 属細菌における PIP 活性の測定 2

実施例 1 2 にて作成した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170、pHN171 で形質転換体した細胞の PIP 活性を実施例 1 3 に準じて測定した。

図 1 3 に終濃度  $1\mu\text{g/ml}$  のチオストレプトンを加えてから時間を追って PIP 活性を測定した結果を示す。該図は Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 で形質転換し、 $30^\circ\text{C}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で PIP を発現させた時の活性を時間を追って測定したものを示す。図 1 3 中、縦軸は PIP の活性値 (ユニット)、横軸は終濃度  $1\mu\text{g/ml}$  のチオストレプトンを加えてからの時間 (分) を示す。 $4^\circ\text{C}$  の「○」は O. D. 600 が 1.0 の時に発現誘導開始させた時、「□」は O. D. 600 が 2.0 の時に発現誘導開始させた時の活性を示す。 $30^\circ\text{C}$  の「○」は O. D. 600 が 0.6 の時に発現誘導開始させた時、「□」は O. D. 600 が 1.0 の時に発現誘導開始させた時の活性を示す。

また、図 1 4 に加えるチオストレプトンの終濃度を変化させて測定した結果を示すが、発現誘導時間は  $4^\circ\text{C}$  が O. D. 600=2.0 で誘導開始し、2400 分 (40 時間) で、 $30^\circ\text{C}$  が O. D. 600=0.6 で誘導開始し、960 分 (16 時間) である。図 1 4 に示す実施例においては、Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 で形質転換し、 $30^\circ\text{C}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で PIP を発現させた時の活性を加えるチオストレプトンの濃度を変えて測定したものを示す。図 1 4 中、縦軸は PIP の活性値 (ユニット)、横軸は培地中に添加したチオストレプトンの終濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を示す。

この結果から、発現誘導には  $30^\circ\text{C}$  でも  $4^\circ\text{C}$  でも、 $1\mu\text{g/ml}$  のチオストレプトンで十分なことが判明した。また、発現誘導の時期によるが、 $30^\circ\text{C}$  の場合は 500 から 1000 分 (約 8-16 時間) 程度、 $4^\circ\text{C}$  の場合は 3000 分 (50 時間) からそれ以上で細胞あたりの PIP の発現量は最大に達することが示された。

#### 〔実施例 1 5〕

#### Rhodococcus 属細菌における PIP 活性の測定 3

Rhodococcus erythropolis JCM3201 株、Rhodococcus fascians JCM10002 株、Rhodococcus opacus DSM44193 株において実施例 1 2 と同様に pHN170 による形質転換を行った。その結果、pHN170 によって Rhodococcus erythropolis のみならず、Rhodococcus fascians、Rhodococcus opacus をも形質転換することができた。従って、pHN170 中に導入された、Rhodococcus erythropolis JCM2895 株由来の自律複製起点は Rhodococcus fascians、Rhodococcus opacus においても機能することが示された。また、これらの形質転換体を用いて、実施例 1 3 に準じて PIP 活



性を測定した。なお、いずれの菌株においても、発現誘導時間は 4℃が O. D. 600=2.0 で誘導開始し、2400 分 (40 時間) で、30℃が O. D. 600= 0.6 で誘導開始し、960 分 (16 時間) である。結果を図 15 に示す。図 15 には、Rhodococcus erythropolis JCM3201 株、Rhodococcus fascians JCM10002 株、Rhodococcus opacus DSM44193 株を pHN170 で形質転換し、30℃、4℃で PIP を発現させた時と発現させない時、それぞれの PIP 活性を測定した。図には終濃度 1  $\mu$ g/ml のチオストレプトンを加えたか否か (+ または -)、活性値、培養温度、活性測定に使用した培養液量、pHN170 で形質転換された宿主、が示されている。

pHN170 で形質転換されたすべての Rhodococcus 属細菌において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。しかし、Rhodococcus fascians JCM10002 株、Rhodococcus opacus DSM44193 株においては Rhodococcus erythropolis JCM3201 株に比べて発現は低かった。

#### 〔実施例 16〕

#### Rhodococcus 属細菌における外来タンパク質の発現と精製 1

pHN170 (実施例 7 に記載)、pHN171 (実施例 7 に記載) を用いて、実施例 12 と同様に Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を形質転換し、実施例 13 に準じて PIP を 30℃、4℃でそれぞれ発現させた。ここでは、終濃度 1  $\mu$ g/ml のチオストレプトンを加えた後、時間を追って菌体を回収し、PIP の精製を行った。PIP の C 末端には 6×His タグがついており、Ni-NTA Superflow (Qiagen 社製) を用いて、その使用説明書に準じて精製を行った。

以下に具体的な精製法を示すが、精製の作業は 4℃で行った。タンパク質を発現させた菌体 (20ml 培養液分) を回収し、1ml の NT-Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール) に懸濁し、1g のガラスビーズ (直径 0.105-0.125 ミリメートル) を加えた。これを Fast-prep FP120 (SAVANT 社製) にて 6m/秒の速度、20 秒間往復振とうさせることで、細胞を破壊した。20,000×g にて遠心し、その上清 700  $\mu$ l に、予め NT-Buffer で平衡化された Ni-NTA Superflow をベッド体積 40  $\mu$ l になるように加えた。これを 1 時間回転攪拌しながら Ni-NTA Superflow ビーズと 6×His タグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズを NT-Buffer で 4 回洗浄した後、120  $\mu$ l の NTE-Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.0)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、400mM イ

ミダゾール) に 3 回懸濁することで、ビーズから 6×His タグのついたタンパク質を溶出させた。

上記サンプルのうち 10  $\mu$ l を常法に従い、12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図 16 に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 (TipA 遺伝子プロモーターからの発現: 左 2 枚の図)、pHN171 (TipA-LG10 プロモーターからの発現: 右 2 枚の図) で形質転換し、4℃ (上 2 枚の図)、30℃ (下 2 枚の図) で PIP を発現させた。終濃度 1  $\mu$ g/ml のチオストレプトンを加えてから、時間を追って菌体を回収し、PIP の C 末端につけられた 6×His タグを利用して Ni-NTA Superflow を用いて精製した。菌体を回収した時間は 4℃においては、0 分 (一番左のレーン)、180 分 (左から 2 番目のレーン)、420 分 (左から 3 番目のレーン)、1080 分 (左から 4 番目のレーン)、1440 分 (左から 5 番目のレーン)、1860 分 (左から 6 番目のレーン)、2520 分 (左から 7 番目のレーン)、3060 分 (左から 8 番目のレーン) で、30℃においては、0 分 (1 番左のレーン)、120 分 (左から 2 番目のレーン)、240 分 (左から 3 番目のレーン)、420 分 (左から 4 番目のレーン)、540 分 (左から 5 番目のレーン)、720 分 (左から 6 番目のレーン)、900 分 (左から 7 番目のレーン)、1440 分 (左から 8 番目のレーン) である。図 16 の各図中、一番右のレーンは誘導せずに (すなわちチオストレプトンを加えずに) 培養を続けた菌体から精製したサンプルを示す。30℃においては、TipA 遺伝子プロモーターからの発現に比べると TipA-LG10 プロモーターからの発現は若干低かったが、4℃においては、逆に TipA-LG10 プロモーターからの発現の方が高かった。また、TipA-LG10 プロモーターにおいても発現の誘導は厳密にコントロールされていた。

両プロモーターからの発現量の詳細な比較は実施例 18 に詳しく述べる。

#### [実施例 17]

#### Rhodococcus 属細菌における外来タンパク質の発現と精製 2

pHN170 (実施例 7 に記載)、pHN171 (実施例 7 に記載) を用いて、実施例 12 と同様に Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を形質転換し、実施例 13 に準じて PIP を 32℃、30℃、15℃、4℃でそれぞれ発現させた。なお、発現誘導時間は 4℃が O. D. 600=2.0 で誘導開始し、2400 分 (40 時間) で、15℃が O. D. 600=1.0 で誘導開始し、1500 分 (25 時間) で、30℃が O. D. 600=0.6 で誘導開始し、960 分 (16 時

間)で、32℃が O. D. 600= 0.6 で誘導開始し、960 分 (16 時間) である。加えたチオストレプトンは終濃度 1  $\mu$ g/ml である。精製は実施例 16 と同様に行った。

上記サンプルのうち 10  $\mu$ l を常法に従い、12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図 17 に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 (TipA 遺伝子プロモーターからの発現: レーン 1, 3, 5, 7)、pHN171 (TipA-LG10 プロモーターからの発現: レーン 2, 4, 6, 8) で形質転換し、4℃ (レーン 7, 8)、15℃ (レーン 5, 6)、30℃ (レーン 3, 4)、32℃ (レーン 1, 2)、で PIP を発現させた。PIP の C 末端につけられた 6 $\times$ His タグを利用して Ni-NTA Superflow を用いて精製した。

32℃から 4℃の広範な温度域において、TipA 遺伝子プロモーター、並びに TipA-LG10 プロモーターからの PIP の発現が確認された。32℃、30℃においては TipA プロモーターからの PIP の発現量の方が多かったが、15℃、4℃においては TipA-LG10 プロモーターからの発現の方が多かった。

〔実施例 18〕

#### Rhodococcus 属細菌における外来タンパク質の発現と精製 3

PIP 以外のタンパク質も該発現ベクターを用いて、発現させることができるかどうか調べるために、以下の実験を行った。

プラスミド pRSET-ATPIP をテンプレートとして、配列表中の配列番号 48、49 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、Arabidopsis thaliana 由来 PIP 遺伝子 (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996): 以下 AtPIP と略記) を含む DNA を得た。この 1.0kb の DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-CH1、並びに pTip-LCH1 の NcoI、XhoI 部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA 遺伝子プロモーターもしくは TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた AtPIP 遺伝子 (6 $\times$ His タグを C 末端に持つ) を含むプラスミドが作成され、pHN176、pHN177 とそれぞれ名前を付けた。

プラスミド pTrc99a-GFP をテンプレートとして、配列表中の配列番号 50、51 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、Aequorea victoria 由来蛍光緑色タンパク質をコードする遺伝子 (以下 GFP と略記) を含む DNA を得た。0.8kb の DNA 断片を制限酵素 BspHI と SmaI で二重消化し、pTip-NH1 並びに pTip-LNH1 の NcoI、SnaBI 部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA 遺

伝子プロモーターもしくは TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた GFP (6×His タグを N 末端に持つ) 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN187、pHN186 とそれぞれ名前を付けた。

プラスミド pGEX-2T (アマシャムバイオサイエンス社) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 52、53 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子 (以下 GST と略記) を含む DNA を得た。0.7kb の DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-NH2、並びに pTip-LNH2 の NcoI、XhoI 部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA 遺伝子プロモーターもしくは TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた GST 遺伝子 (6×His タグを N 末端に持つ) を含むプラスミドが作成され、pHN282、pHN283 とそれぞれ名前を付けた。

pHN170 (実施例 7 に記載)、pHN171 (実施例 7 に記載)、pHN176、pHN177、pHN187、pHN186、pHN282、pHN283 を用いて、実施例 12 と同様に Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を形質転換し、実施例 13 に準じて PIP、AtPIP、GFP、GST 各タンパク質を 30℃、4℃ でそれぞれ発現させた。いずれも、発現誘導時間は 4℃ が O. D. 600=2.0 で誘導開始し、2400 分 (40 時間) で、30℃ が O. D. 600=0.6 で誘導開始し、960 分 (16 時間) で、加えたチオストレプトンは終濃度 1 μg/ml である。なお、4℃ では 50ml、30℃ では 20ml の培養液から精製を行った。

上記 4 種のタンパク質には全て 6×His タグがついており、実施例 16 に準じて精製を行った。

上記サンプルのうち 10 μl を常法に従い、12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図 18 に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に PIP: レーン 1、9)、pHN171 (TipA-LG10 プロモーターの下流に PIP: レーン 2、10)、pHN176 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に AtPIP: レーン 3、11)、pHN177 (TipA-LG10 プロモーターの下流に AtPIP: レーン 4、12)、pHN187 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に GFP: レーン 5、13)、pHN186 (TipA-LG10 プロモーターの下流に GFP: レーン 6、14)、pHN282 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に GST: レーン 7、15)、pHN283 (TipA-LG10 プロモーターの下流に GST: レーン 8、16) で形質転換し、4℃ (レーン 9 から 16) 30℃ (レーン 1 から 8) で各タンパク質を発現させた。各タンパク質の末端につけられた 6×His

タグを利用して Ni-NTA Superflow を用いて精製した。

また、デンストメーターにてバンドの密度を測定し、定量した結果を図 19 に示すが、これは図 18 で示された SDS ポリアクリルアミド電気泳動像のバンドから定量したものである。該図では、それぞれの外来タンパク質が 1 リットルの培養液からどれだけ精製されたかを示す。単位は mg で示されている。一番右のカラム（倍率）は、TipA 遺伝子プロモーターを用いて発現させた場合に比べて、TipA-LG10 プロモーターを用いて発現させた場合、何倍のタンパク質が精製されるか示されている。この結果、4℃において、TipA 遺伝子プロモーターよりも TipA-LG10 プロモーターから発現させる方が、得られる組み換えタンパク質の量が多いことがわかった。しかし、30℃の場合は必ずしも TipA-LG10 プロモーターから発現させる方が、得られる組み換えタンパク質の量が多いとは限らなかった。

#### 〔実施例 19〕

大腸菌に対して 30℃で増殖阻害効果を示すマウス由来タンパク質の分離

具体的にどの遺伝子が発現されると宿主に対して増殖阻害効果を示すのかを調べるために、マウス肝臓由来の Poly(A)<sup>+</sup>RNA (STRATAGENE 社製) を用いて大腸菌用発現ライブラリーを構築した。以下に具体的に述べる。

大腸菌用発現ベクターはアラビノース誘導性ベクターを用いることとした。まず該ベクター、pBAD/HisA (Invitrogen 社製) において、cDNA の導入を容易にするために、マルチクローニング部位を改変した pBAD-Linker を作成した。以下にその作成過程を述べる。配列表中の配列番号 54、55 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (EcoRI、BglII、XhoI 認識部位からなるクローニング配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を等モル量ずつ混合し、70℃で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。結果、その末端は NcoI と HindIII で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、これを pBAD/HisA の NcoI、HindIII 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pBAD-Linker と名前をつけた。

STRATAGENE 社製 cDNA synthesis kit を用い、その使用説明書に従って、上記 Poly(A)<sup>+</sup>RNA より 2 本鎖 cDNA を合成した。次いで、この cDNA を pBAD-Linker の EcoRI、XhoI 部位にライゲーションした。このライゲーション産物を常法に従い、

大腸菌 TOP10 (Invitrogen 社製) に形質転換し、50  $\mu$ g/ml アンピシリン入り LB 寒天培地上にて、5 万個の形質転換体を得た。その寒天培地のレプリカを 50  $\mu$ g/ml アンピシリンと 0.2% L-アラビノースを含んだ LB 寒天培地に GenHunter 社製 Easy Transfer Replica Plating Device を用いて作成し、タンパク質の発現を誘導させ、30℃にて一晩インキュベートした。その結果、アラビノースを含まない培地上では生育できるが、アラビノースを含む培地上では生育できないコロニーが 426 個選別された。

この 426 個の TOP10 形質転換体を 1.5ml の 50  $\mu$ g/ml アンピシリン入り LB 培地にて培養した後、常法に従いプラスミドを分離、精製した。得られたプラスミドは制限酵素 EcoRI、XhoI の二重消化後、1%アガロース電気泳動に供し、マウス由来の cDNA 断片の長さを見積もった。さらに、得られたプラスミドは配列表中の配列番号 5 6 記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド用い、DNA シークエンサー ABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer にて、マウス由来 cDNA 部分の塩基配列を約 500 塩基決定した。その結果を図 20 に示す。該図は BLAST プログラムを用いて、決定された DNA 配列を元に相同性検索を行い、遺伝子を同定した結果を示す。

#### 〔実施例 20〕

Rhodococcus 属細菌、並びに大腸菌における外来タンパク質の発現と精製

実施例 19 にて分離した遺伝子のうち、Serum amyloid A (Saa1)、NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4、Cytochrome b5 like、RIKEN1500015G18、Transferrin、Apolipoprotein A-V、Pantotenate kinase 1 $\beta$ 、Peroxioredoxin 4、RIKEN1300017J02 (Transferrin Homolog) を Rhodococcus erythropolis JCM3201 と大腸菌 TOP10 を宿主として発現させた。また、以下の 4 群、10 種類のタンパク質も同様に発現させた。1 群) 大腸菌で発現させると不活性な封入体となることが知られている 3 種類のプロテアーゼ、Cathepsin D、Prothrombin、Kallikrein 6、2 群) その生理活性から大腸菌での発現が困難だと予想される 2 種類の DNase、LSDNase、DLAD、3 群) 他のグループの研究で、その細胞増殖阻害活性により大腸菌での発現が困難だとされているもの、HMG-1、Kid1、Bax alpha、4 群) 他のグループの研究で、低温依存的に可溶化されるとされているもの、Glucokinase、p37A。なお、Rhodococcus erythropolis においては 30℃と 4℃で、大腸菌は 30℃

で組み換えタンパク質をそれぞれ発現させた。以下に詳しく述べる。

プラスミド LE20 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 57、58 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Serum Amyloid Protein A タンパク質 (Meeker et al., Proteins 30 381-387 (1998)) をコードする Saa1 遺伝子 (GenBank 受入番号 M11131) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Saa1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN205 と名前を付けた。また、プラスミド LE20 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 59、60 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Saa1 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と KpnI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、KpnI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Saa1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN193 と名前を付けた。

プラスミド L113 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 61、62 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4 をコードする遺伝子 (Walker et al., J. Mol. Biol. 226 1051-1072 (1992) : GenBank 受入番号 BC011114 : 以下 NADH4 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた NADH4 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN206 と名前を付けた。また、プラスミド L113 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 63、62 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 NADH4 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた NADH 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN195 と名前を付けた。

プラスミド L3 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 64、65 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Cytochrome b5 like タンパク質をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 AK002426 : 以下 Cytochrome b5l と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI

で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Cytochrome b5l 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN208 と名前を付けた。また、プラスミド L3 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 66、65 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Cytochrome b5l 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Cytochrome b5l 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN199 と名前を付けた。

プラスミド LE123 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 67、68 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来機能不明な推定上のタンパク質をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 NM#025439 : 以下 LE123 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた LE123 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN287 と名前を付けた。また、プラスミド LE123 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 69、68 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 LE123 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた LE123 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN276 と名前を付けた。

プラスミド LE280 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 70、71 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Transferrin をコードする遺伝子 (Mason et al., Protein Expr. Purif. 23 142-150 (2001) : GenBank 受入番号 BC022986) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と HindIII で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、HindIII で部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Transferrin 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN289 と名前を付けた。また、プラスミド LE280 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 72、71 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Transferrin 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と HindIII で二重消化し、pBAD/HisA



の XhoI、HindIII 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Transferrin 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN277 と名前を付けた。

プラスミド LE295 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7 3、7 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Apolipoprotein A-V をコードする遺伝子 (van der Vliet et al., J. Biol. Chem. 276 44512-44520 (2001) : GenBank 受入番号 NM#080434:以下 Apoa5 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Apoa5 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN288 と名前を付けた。また、プラスミド LE295 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7 5、7 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Apoa5 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Apoa5 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN281 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A) <sup>t</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 7 6、7 7 に記載のプライマーにて、RT-PCR (Larrick, Trends Biotechnol. 10 146-152 (1992)) による増幅を行った。RT-PCR には STRATAGENE 社製の ProSTAR Ultra HF RT-PCR System を用い、その使用説明書通りに行った (以下全ての RT-PCR は同キットを用いて行った)。その結果、マウス由来 Cathepsin D 遺伝子 (Grusby et al., Nucleic Acids Res. 18 4008 (1990)、Babe et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 17 213-252 (2000) : GenBank 受入番号 X52886) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH1 の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Cathepsin D 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN270 と名前を付けた。また、pHN270 を NcoI と SalI で二重消化して得られた 1.2kb の DNA 断片を pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN273 と名前をつけた。

マウス肝臓 Poly (A) <sup>t</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 7 8、7 9 に記載のプ

ライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Prothrombin 遺伝子 (Degen et al., DNA Cell Biol. 9 487-498 (1990) : GenBank 受入番号 X52308) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH1 の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Prothrombin 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN271 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 80、81 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Kallikrein 6 遺伝子 (Evans et al., J. Biol. Chem. 262 8027-8034 (1987)、Babe et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 17 213-252 (2000) : GenBank 受入番号 NM#010639) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH1 の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Kallikrein6 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN272 と名前を付けた。また、pHN272 を NcoI と SalI で二重消化して得られた 0.7kb の DNA 断片を pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN275 と名前をつけた。

マウス肝臓 Poly (A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 82、83 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 LSDNase 遺伝子 (Baron et al., Gene 215 291-301 (1998) : GenBank 受入番号 AF047355) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた LSDNase 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN299 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 84、85 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 DLAD 遺伝子 (Shiokawa and Tanuma, Nucleic Acids Res. 27 4083-4089 (1999) : GenBank 受入番号 AF128888) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた DLAD 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN284 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 86、87 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 HMG-1 遺伝子 (Pauken et al., Mamm. Genome 5 91-99 (1994)、Lee et al., Gene 225 97-105 (1998) : GenBank 受入番号 U00431) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた HMG-1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN285 と名前を付けた。また、プラスミド pHN285 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 88、87 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 HMG-1 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた HMG-1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN305 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 89、90 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Kid1 遺伝子 (Tekki-Kessarlis et al., Gene 240 13-22 (1999)、Suter-Crazzolara and Unsicker Bio/Technology 19 202-204 (1995) : GenBank 受入番号 AF184111) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と HindIII で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、HindIII 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Kid1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN286 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 91、92 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Bax alpha 遺伝子 (Oltvai et al., Cell 74 609-619 (1993)、Donnelly et al., Protein Expr. Purif. 22 422-429 (2001) : GenBank 受入番号 L22472) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Bax alpha 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN217 と名前を付けた。また、プラスミド pHN217 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 93、92 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Bax alpha 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA

の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Bax alpha 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN212 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表中の配列番号 9 4、9 5 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Glucokinase 遺伝子 (Lin et al., Protein Expr. Purif. 1 169-176 (1990) : GenBank 受入番号 BC011139) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Glucokinase 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN298 と名前を付けた。また、pHN298 を NcoI と XhoI で二重消化して得られた 1.4kb の DNA 断片を pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN306 と名前をつけた。

pET22b-Dmp37A を用いて、配列表中の配列番号 1 0 5、9 6 に記載のプライマーにて、PCR による増幅を行った。その結果、Drosophila melanogaster 由来 p37A をコードする遺伝子 (Holzl et al., J. Cell Biol. 150 119-129 (2000) : GenBank 受入番号 AF145312) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH2 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた p37A 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN291 と名前を付けた。また、プラスミド pHN291 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9 7、2 5 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、Drosophila melanogaster 由来 p37A 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 SalI で消化後、NcoI で部分消化し (p37A 内部の NcoI で切断しないように)、pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた p37A 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN308 と名前を付けた。

プラスミド LE59 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9 8、9 9 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Pantothenate kinase 1 beta タンパク質をコードする遺伝子 (Rock et al., J. Biol. Chem. 275 1377-1383 (2000) : GenBank 受入番号 AF200357 : 以下 PanK と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA

の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた PanK 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN279 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A)<sup>+</sup>RNA を用いて、配列表 100、101 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Peroxiredoxin 4 をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 BC019578) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と KpnI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、KpnI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Peroxiredoxin 4 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN278 と名前を付けた。

プラスミド LE156 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 102、103 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Transferrin 様タンパク質をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 AK005035 : 以下 TFL と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた TFL 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN280 と名前を付けた。

また、上述したタンパク質のうち、シグナルペプチドを持つものは全てシグナルペプチドをコードする DNA 配列を除いてサブクローンされている。また、Prothrombin は成熟 Thrombin になる直前の「Prethrombin-2」をコードする DNA 配列 (Soejima et al., J. Biochem. 130 269-277 (2001)) がサブクローンされている。

pHN171 (実施例 7 に記載)、pHN205、pHN206、pHN208、pHN287、pHN289、pHN288、pHN270、pHN271、pHN272、pHN299、pHN284、pHN285、pHN286、pHN217、pHN298、pHN291 を用いて、実施例 12 と同様に Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を形質転換し、実施例 13 に準じて各タンパク質を 30℃、4℃ でそれぞれ発現させた。

これらのタンパク質には全て 6×His タグが末端についており、実施例 16 と同様に精製を行った。またこれに加え、今回は細胞破壊後に 20,000×g にて遠心してできた沈殿 (実施例 16 に記載) から精製を行った。具体的に以下に沈殿物からの精製法を示すが、その作業は室温で行った。1ml の DN-Buffer (50mM

Tris-HCl (pH8.0)、8M 尿素) に沈殿物を懸濁し、20,000×g にて遠心し、その上清 700  $\mu$ l に、予め DN-Buffer で平衡化された Ni-NTA Superflow をベッド体積 40  $\mu$ l になるように加えた。これを 1 時間回転攪拌しながら Ni-NTA Superflow ビーズと 6×His タグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズを DN-Buffer で 4 回洗浄した後、120  $\mu$ l の DNE-Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.0)、8M 尿素、400mM イミダゾール) に 3 回懸濁することで、ビーズから 6×His タグのついたタンパク質を溶出させた。

pBAD/His/lacZ (Invitrogen 社)、pHN193、pHN195、pHN199、pHN276、pHN277、pHN281、pHN273、pHN275、pHN305、pHN212、pHN306、pHN308、pHN279、pHN278、pHN280 を用い、Invitrogen 社の pBAD/His キットの使用説明書の通りに、大腸菌にてタンパク質の発現を行った。

以下に具体的な精製法を示す。タンパク質を発現させた菌体を回収し、1ml の NT-Buffer に懸濁した。これを超音波発生器 UD-20 (TOMY 社製) を用いて細胞を破壊した。20,000×g にて遠心し、その上清 900  $\mu$ l に、予め、NT-Buffer で平衡化された Ni-NTA Superflow をベッド体積 40  $\mu$ l になるように加えた。これを 1 時間回転攪拌しながら Ni-NTA Superflow ビーズと 6×His タグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズを NT-Buffer で 4 回洗浄した後、120  $\mu$ l の NTE-Buffer に 3 回懸濁することで、ビーズから 6×His タグのついたタンパク質を溶出させた。上記の作業はすべて 4℃で行った。

また、細胞破壊後、20,000×g にて遠心してできた沈殿からも精製を行ったが、その作業工程は上述した方法と同様である。

上記サンプルのうち 10  $\mu$ l を常法に従い 12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供し、デンストメーターにてバンドの密度を測定し、定量した結果を図 21 に示す。該図において、左から 2 番目のカラムは発現させたタンパク質の名前を示す。左から 3 番目のカラムは発現させたタンパク質の N 末端、C 末端どちらに 6×His タグを付けたかを示す。左から 4 番目のカラムは、シグナル配列等を含めた完全長のタンパク質の推定分子量 (kDa) を示すが、括弧内の数字は実際に発現させたタンパク質部分の推定分子量を示す。左から 5、9 番目のカラムはタンパク質を発現させた時に用いたプラスミドの名前を示す。左から 6、8、10 番目のカラムは 1 リットルの培養液あたり、得られた組み換えタンパク質の質量を示すが(単

位はミリグラム)、20,000×g での上清画分 (Sup) から精製したときと、沈殿画分 (Ppt) から精製したときとに分けて示してある。左から 7、11 番目のカラム中の +、- はそれぞれの形質転換体を発現誘導剤 (Rhodococcus erythropolis の場合は 1 μg/ml のチオストレプトン、大腸菌の場合は 0.2% L-アラビノース) を含んだ寒天培地上に塗布した時の、増殖の速度を表している。最も早く増殖した形質転換体が +++ で、全く増殖しなかった形質転換体が - である。また、用いた宿主、発現誘導時の温度が最上部に示されている。N. D. (Not Detected) は検出限界以下だったことを示す。

表 1 に実施例で用いた各プラスミドのリストを、表 2 に実施例で用いた菌株のリストを示す。

表 1

カテゴリー	プラスミド名	備考	ソース
市販のクローニングベクター	pB luescript II SK (+)	Conventional vector for general cloning	Stratagene
	pGEM 3Z (+)	Conventional vector for general cloning	Promega
発現ベクターのソース	pRE2895	Source of RepA&B Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2895)	This study
	pHN136	Backbone of the expression vector	This study
	pHN143	Source of $\text{Thb}^r$	This study
	pHN62	Source of ALDHp-TpA (inducer cassette)	This study
	pHN153	Source of TAp-PP ORF-ALDHt Expression cassette)	This study
	pHN169	Source of Tufp-Tet <sup>r</sup>	This study
コントロールプラスミド	pHN172	Neither Expression cassette nor inducer cassette	This study
	pHN173	Expression cassette, but no inducer cassette	This study
<i>R. erythropolis</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含まず)	pTb-NH1	TpAp, 6xH is at N-term nus, MCS type1	This study
	pTb-CH1	TpAp, 6xH is at C-term nus, MCS type1	This study
	pTb-NH2	TpAp, 6xH is at N-term nus, MCS type2	This study
	pTb-CH2	TpAp, 6xH is at C-term nus, MCS type2	This study
	pTb-LNH1	TpA-LG10p, 6xH is at N-term nus, MCS type1	This study
	pTb-LCH1	TpA-LG10p, 6xH is at C-term nus, MCS type1	This study
	pTb-LNH2	TpA-LG10p, 6xH is at N-term nus, MCS type2	This study
	pTb-LCH2	TpA-LG10p, 6xH is at C-term nus, MCS type2	This study
	pTb-CH1.1	TpAp, 6xH is at N-term nus, MCS type3	This study
	pTb-CH2.1	TpAp, 6xH is at C-term nus, MCS type3	This study
	pTb-LCH1.1	TpA-LG10p, 6xH is at N-term nus, MCS type3	This study
	pTb-LCH2.1	TpA-LG10p, 6xH is at C-term nus, MCS type3	This study
<i>R. erythropolis</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含む)	pHN170	Target=PP in pTb-CH1	This study
	pHN171	Target=PP in pTb-LCH1	This study
	pHN176	Target=AtPP in pTb-CH1	This study
	pHN177	Target=AtPP in pTb-LCH1	This study
	pHN187	Target=GFP in pTb-NH1	This study
	pHN186	Target=GFP in pTb-LNH1	This study
	pHN282	Target=GST in pTb-NH2	This study
	pHN283	Target=GST in pTb-LNH2	This study
	pHN205	Target=Saa1 in pTb-LNH1	This study
	pHN206	Target=NADH4 in pTb-LNH1	This study
	pHN208	Target=Cytochrome b51 in pTb-LNH1	This study
	pHN287	Target=LE123 in pTb-LNH1	This study
	pHN289	Target=Transferrin in pTb-LNH1	This study
	pHN288	Target=Apoa5 in pTb-LNH2	This study
	pHN270	Target=Cathepsin D in pTb-LCH1	This study
	pHN271	Target=Prothrombin in pTb-LCH1	This study
	pHN272	Target=Kaalkrein6 in pTb-LCH1	This study
	pHN299	Target=LSDNase in pTb-LNH1	This study
	pHN284	Target=DLAD in pTb-LNH2	This study
	pHN285	Target=HMG-1 in pTb-LNH2	This study
	pHN286	Target=Kd1 in pTb-LNH2	This study
	pHN217	Target=Bax alpha in pTb-LNH1	This study
	pHN298	Target=Glucokinase in pTb-LNH1	This study
	pHN291	Target=p37A in pTb-LCH2	This study



カテゴリー	プラスミド名	備考	ソース
<i>E. coli</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含まず)	pBAD/H isA	BAD promoter, 6xHis at N-terminus, Xpress Epitope, MCS	Invitrogen
	pBAD-Linker	BAD promoter, for library construction	This study
<i>E. coli</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含む)	pHN193	Target= <i>Saa1</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN195	Target= <i>NADH4</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN199	Target= <i>Cytochrome b51</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN276	Target= <i>LE123</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN277	Target= <i>Transferrin</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN281	Target= <i>Apoa5</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN273	Target= <i>Cathepsin D</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN275	Target= <i>Kallikrein6</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN305	Target= <i>HMG-1</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN212	Target= <i>Bax alpha</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN306	Target= <i>Glucokinase</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN308	Target= <i>p37A</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN279	Target= <i>PanK</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN278	Target= <i>Peroxiredoxin4</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN280	Target= <i>TFL</i> in pBAD/H isA	This study
	pBAD/H is/ <i>lacZ</i>	Target= <i>lacZ</i>	Invitrogen

表 2

種	株名	別名	ソース	使用
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM 2895	ATCC15962	Japan Collection of Microorganisms	Source of pRE2895 Source of RepA&B)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM 3201	ATCC4277	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins Source of ALDHp Source of ALDht
<i>Rhodococcus fascians</i>	JCM 10002	ATCC12974	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSM 44193	PD630	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	Host strain to express recombinant proteins
<i>Streptomyces coelicolor</i>	JCM 4979	A302	Japan Collection of Microorganisms	Source of Tpa Source of Tufp
<i>Streptomyces azureus</i>	JCM 4217	ATCC14921	Japan Collection of Microorganisms	Source of Thb'
<i>Escherichia coli</i>	TOP10		Invitrogen	Host strain to express recombinant proteins
<i>Escherichia coli</i>	DH5α			General cloning

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

実施例 13 から 18 並びに実施例 20 に示されるように、本発明の発現ベクターを用いることにより、4℃という低温条件下で外来遺伝子のコードするタンパク質を発現産生させることが可能である。

#### 配列表フリーワード

配列 1 ～ 105 : プライマー

配列 106 ～ 113 : ベクター

## 請求の範囲

1. 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、該宿主以外の宿主の好適生育温度範囲以下の温度で発現し得る発現ベクター。
2. 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、15℃以下の温度で発現し得る発現ベクター。
3. 4℃で発現し得る請求項 1 または 2 記載の発現ベクター。
4. 宿主細胞が Rhodococcus 属細菌である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。
5. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、請求項 4 記載の発現ベクター。
6. 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。
7. 外来遺伝子が、15℃を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。
8. 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。
9. 請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。
10. 請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。
11. 宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、該宿主細胞の好適生育温度範囲より低い好適生育温度範囲を有する他の宿主細胞中で誘導物質により誘導発現し得る誘導型発現ベクター。
12. 4℃で発現し得る請求項 11 記載の発現ベクター。
13. 宿主細胞が Rhodococcus 属細菌である、請求項 11 または 12 に記載の発現ベクター。
14. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus

からなる群から選択される、請求項 1 3 記載の発現ベクター。

15. 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

16. 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む請求項 1 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

17. 請求項 1 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

18. 請求項 1 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

19. Rhodococcus 属細菌中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター。

20. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、請求項 1 9 記載の発現ベクター。

21. 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 9 または 2 0 記載の発現ベクター。

22. TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第 1 のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第 2 のプロモーター配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

23. 請求項 1 9 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。

24. 請求項 1 9 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

25. 15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

26. TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第 1 のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第 2 のプロモーター

配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、外来遺伝子を低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌内で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

27. さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域を含み、大腸菌中で複製可能な請求項 26 記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

28. TipA 遺伝子プロモーターが TipA-LG10 プロモーターである請求項 26 または 27 に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

29. 配列番号 106 に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号 107 に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号 108 に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号 109 に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号 110 に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号 111 に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号 112 に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号 113 に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1 および pTip-LCH2.1 からなる群から選択される請求項 26 から 28 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

30. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、請求項 25 から 29 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

31. 請求項 25 から 30 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。

32. 外来遺伝子として 15℃ を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項 25 から 30 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、15℃ を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質を低温で産生させる方法。

33. 15℃ を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃ を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 3

2 記載のタンパク質を低温で産生させる方法。

3 4. 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で 15℃を超える中高温で発現させた場合に不活性な封入体を作るタンパク質である、請求項 3 2 記載のタンパク質を低温で産生させる方法。

3 5. 好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項 2 5 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質を低温で産生させる方法。

3 6. 外来遺伝子を含む請求項 2 5 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、15℃を超える中高温条件下および低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養し、15℃以下の低温条件下でのみ発現される遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

3 7. 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 3 6 記載の 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

3 8. 大腸菌に導入し 15℃を超える中高温で発現させよとした場合に、発現しないかまたは大腸菌の増殖を阻害する遺伝子を選択し、次いで該遺伝子を外来遺伝子として含む請求項 2 5 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養したときに発現しうる遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

3 9. 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌

の増殖を 30℃以上で阻害するタンパク質である、請求項 38 記載のタンパク質をスクリーニングする方法。

40. 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で 15℃を超える中高温で発現させた場合に封入体を作るタンパク質である、請求項 38 記載のタンパク質をスクリーニングする方法。

41. 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 38 記載の 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

42. 請求項 36 から 41 のいずれか 1 項に記載のスクリーニングする方法により得られた 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質。



図 1

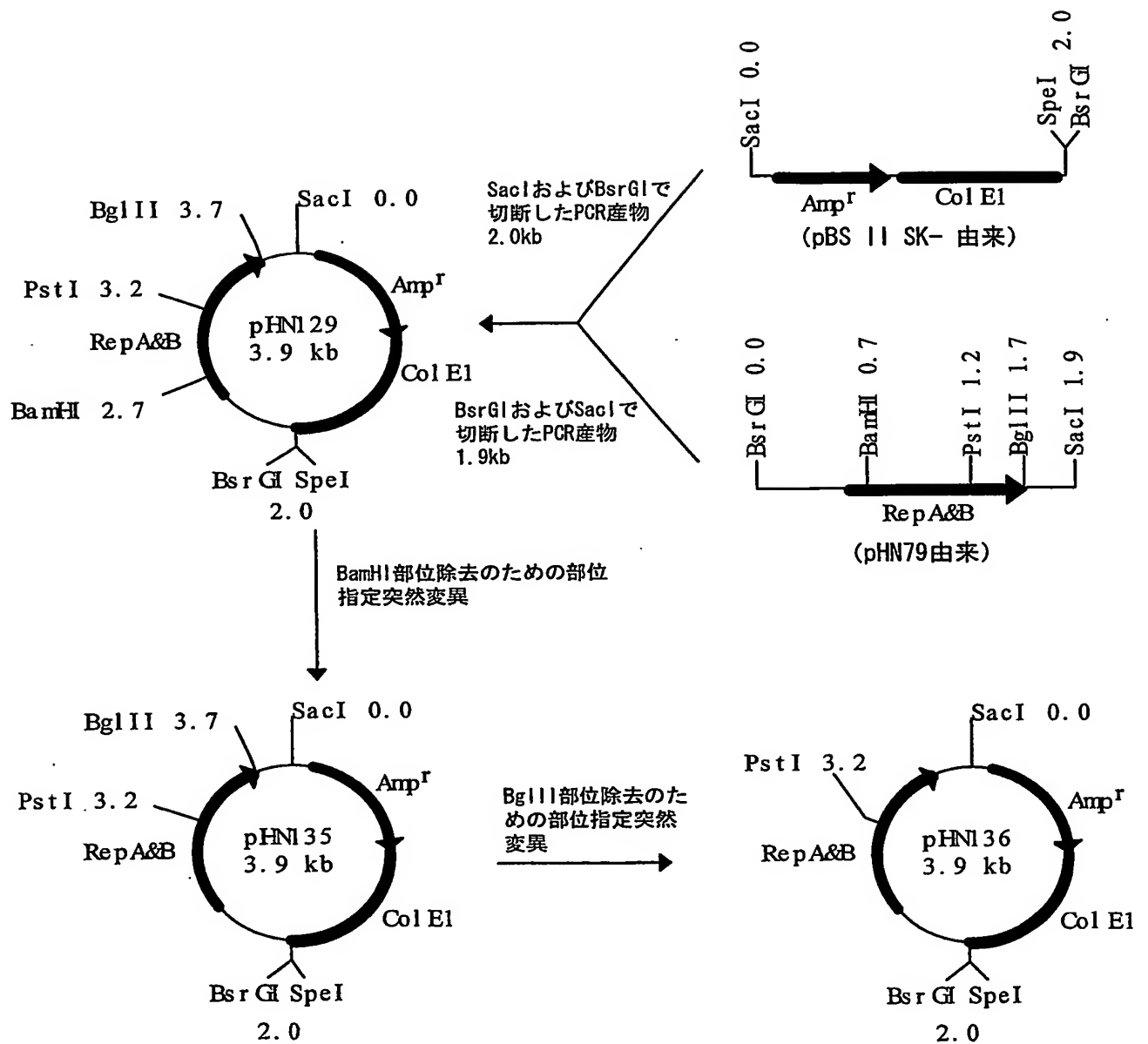


図 2

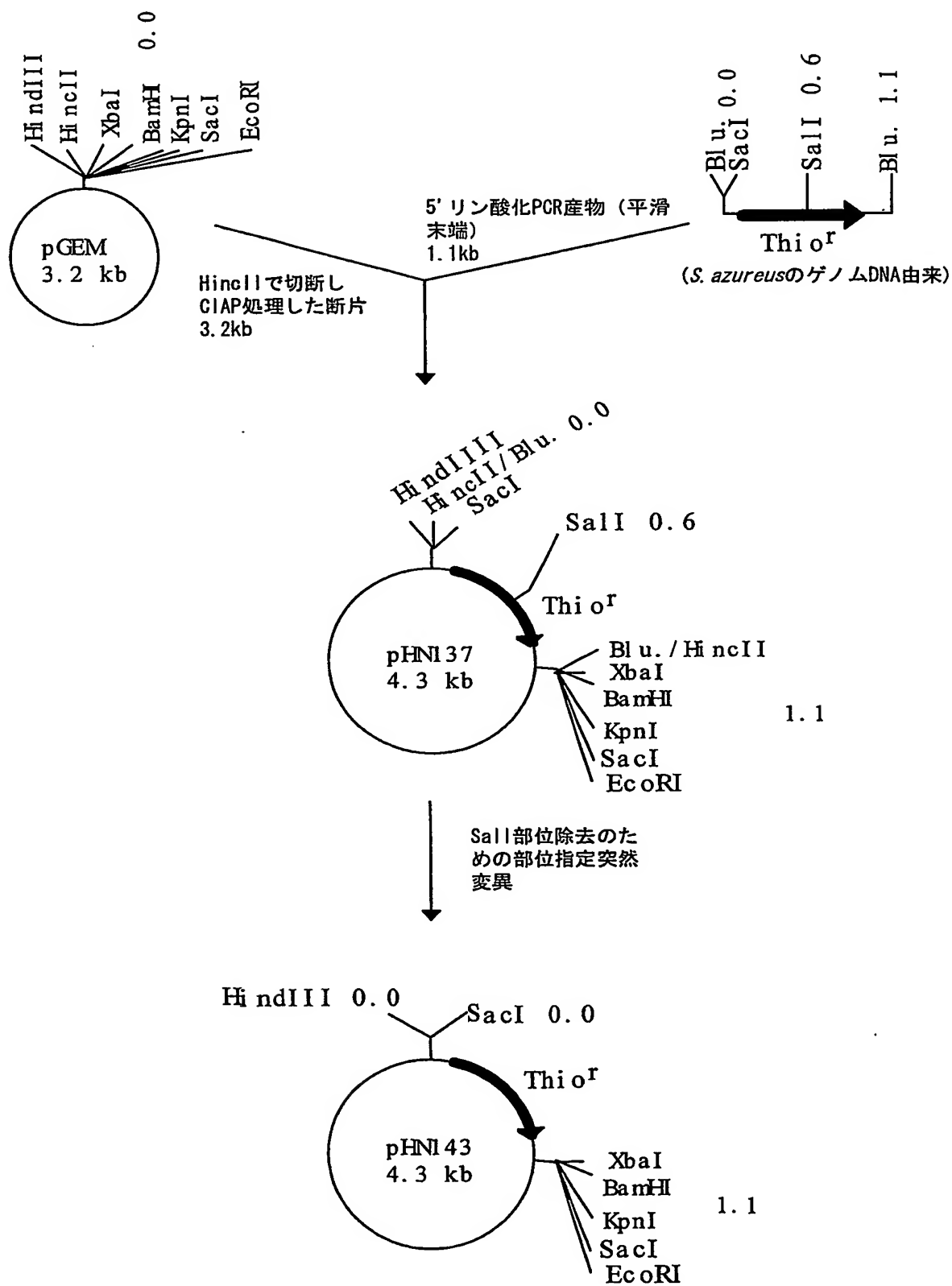


図 3

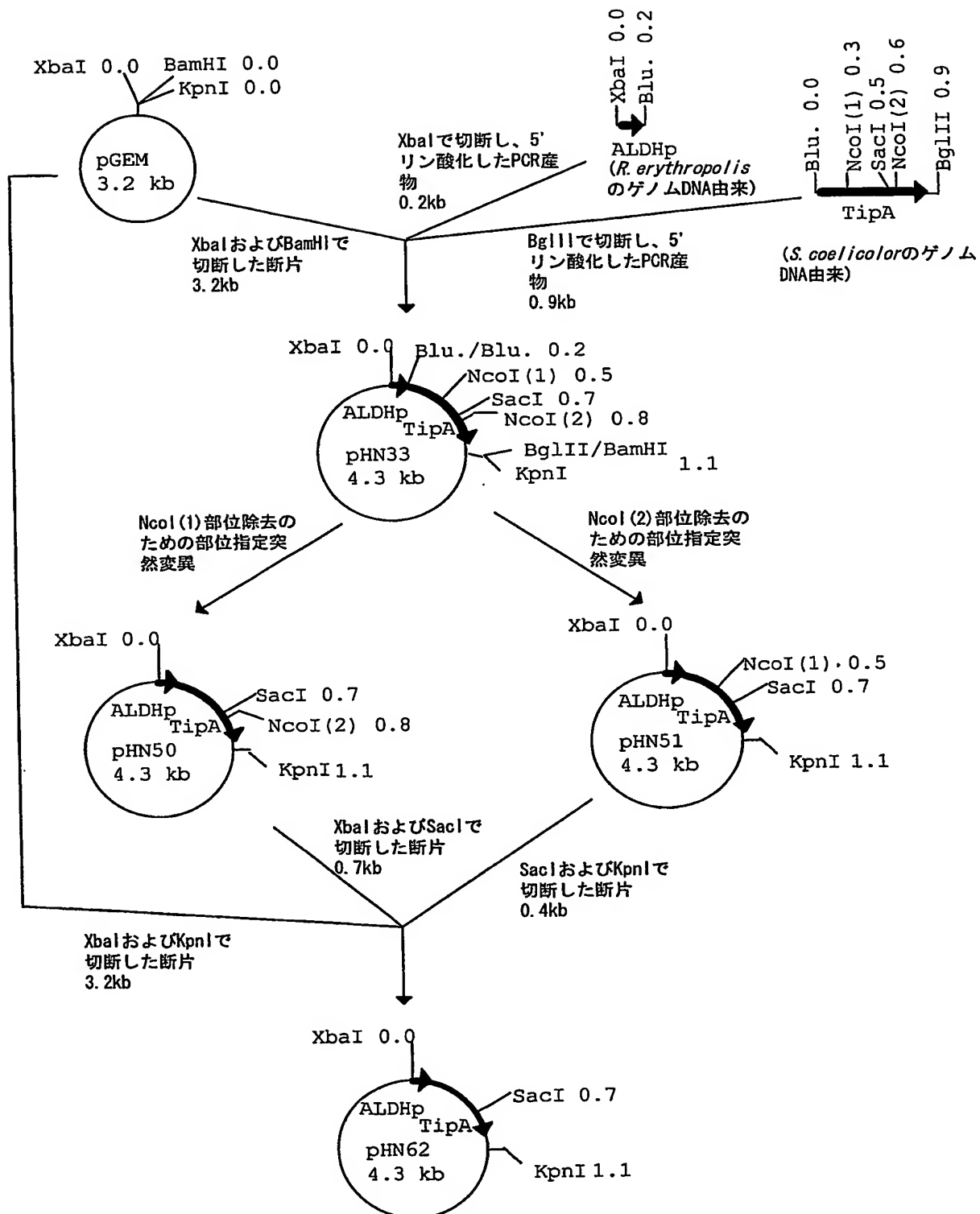


图 4

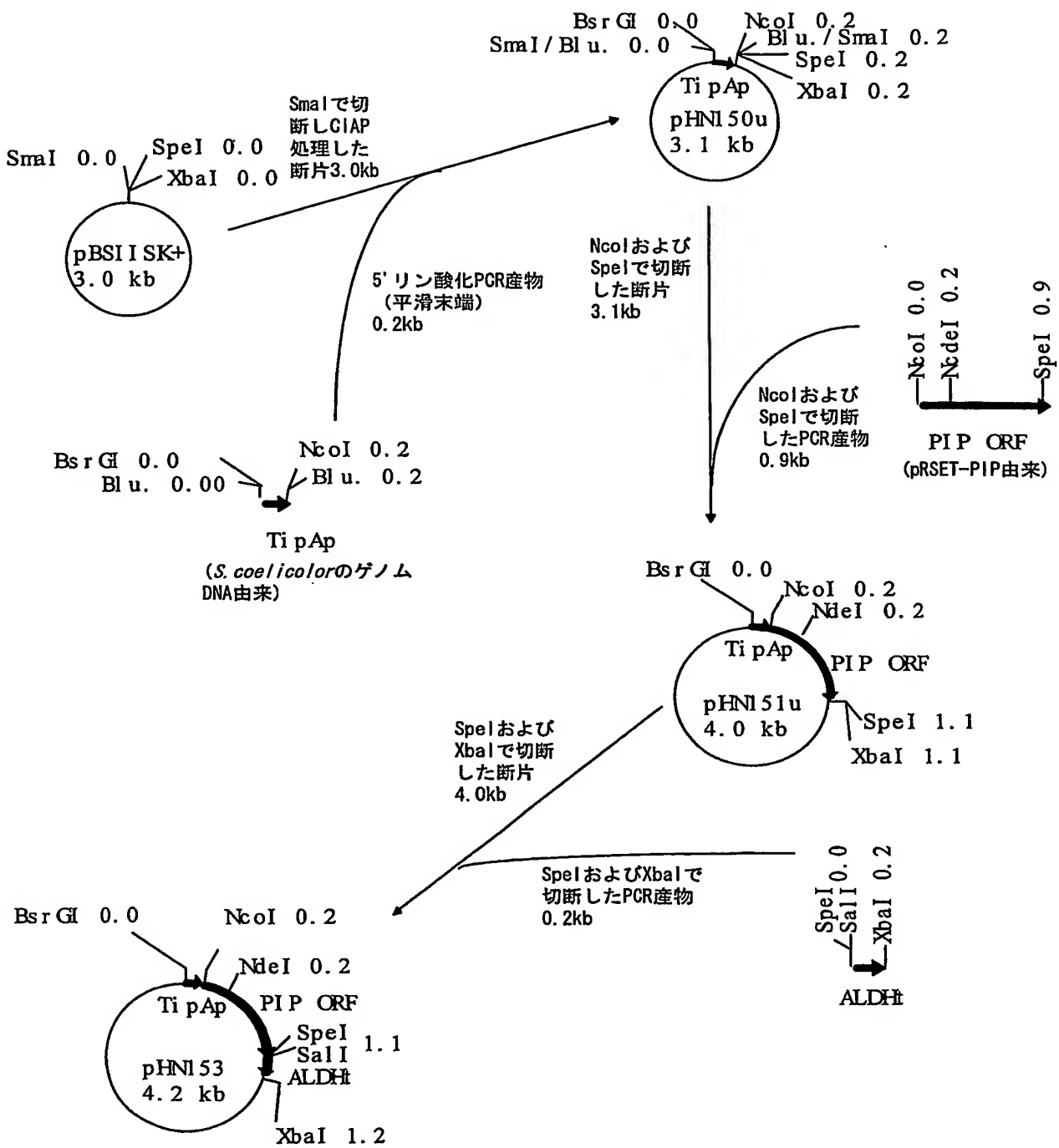


図 5

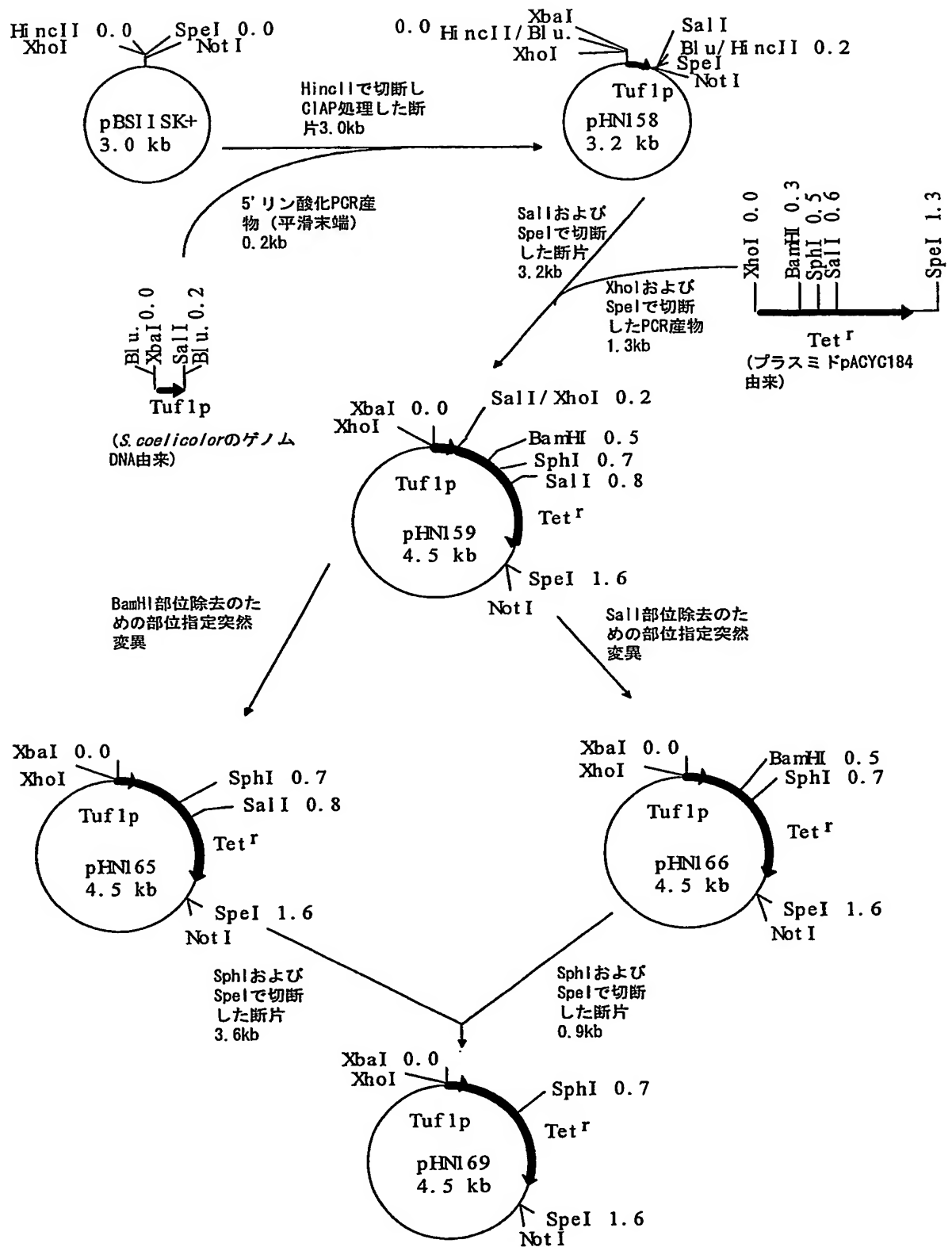


図 6

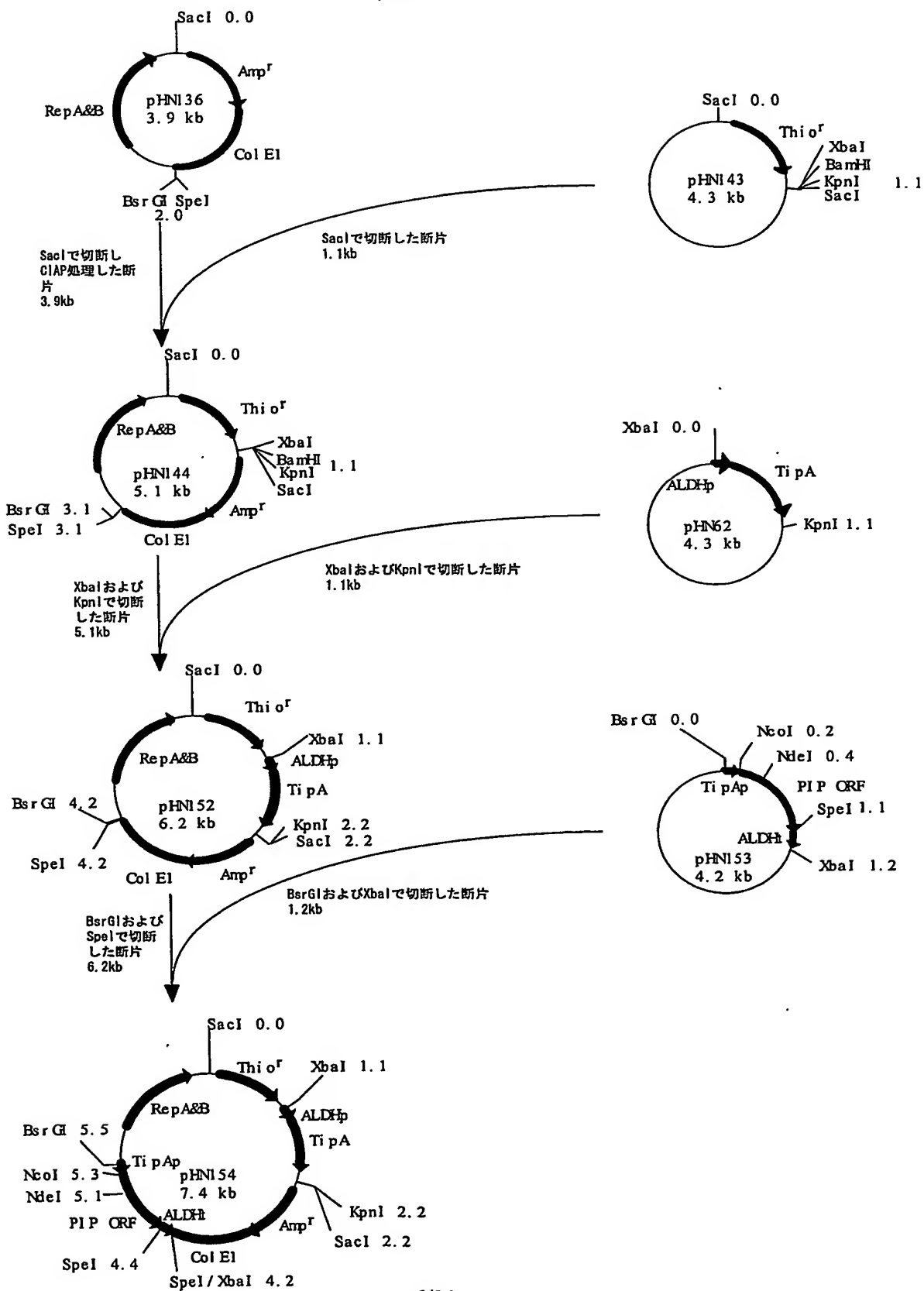
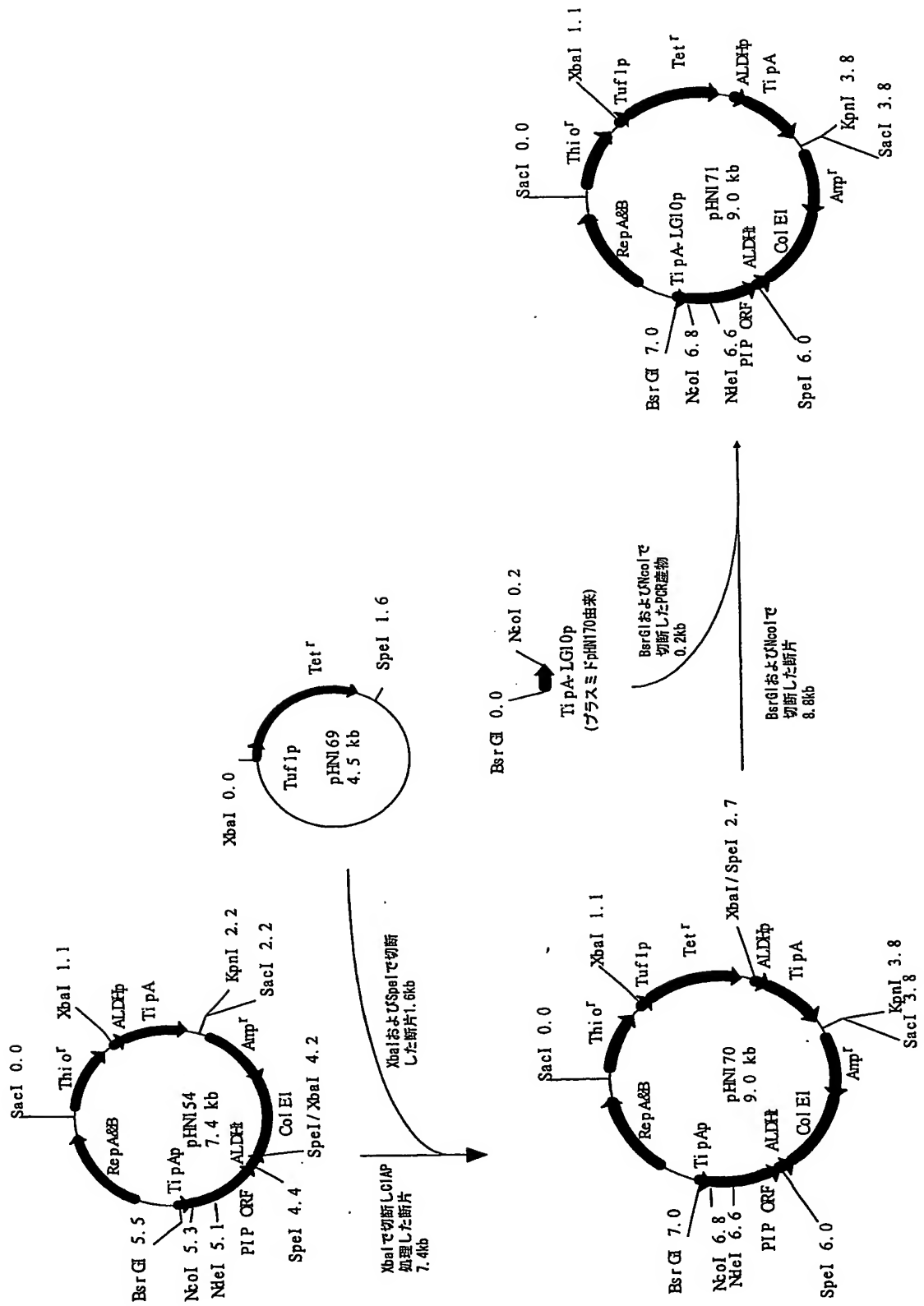
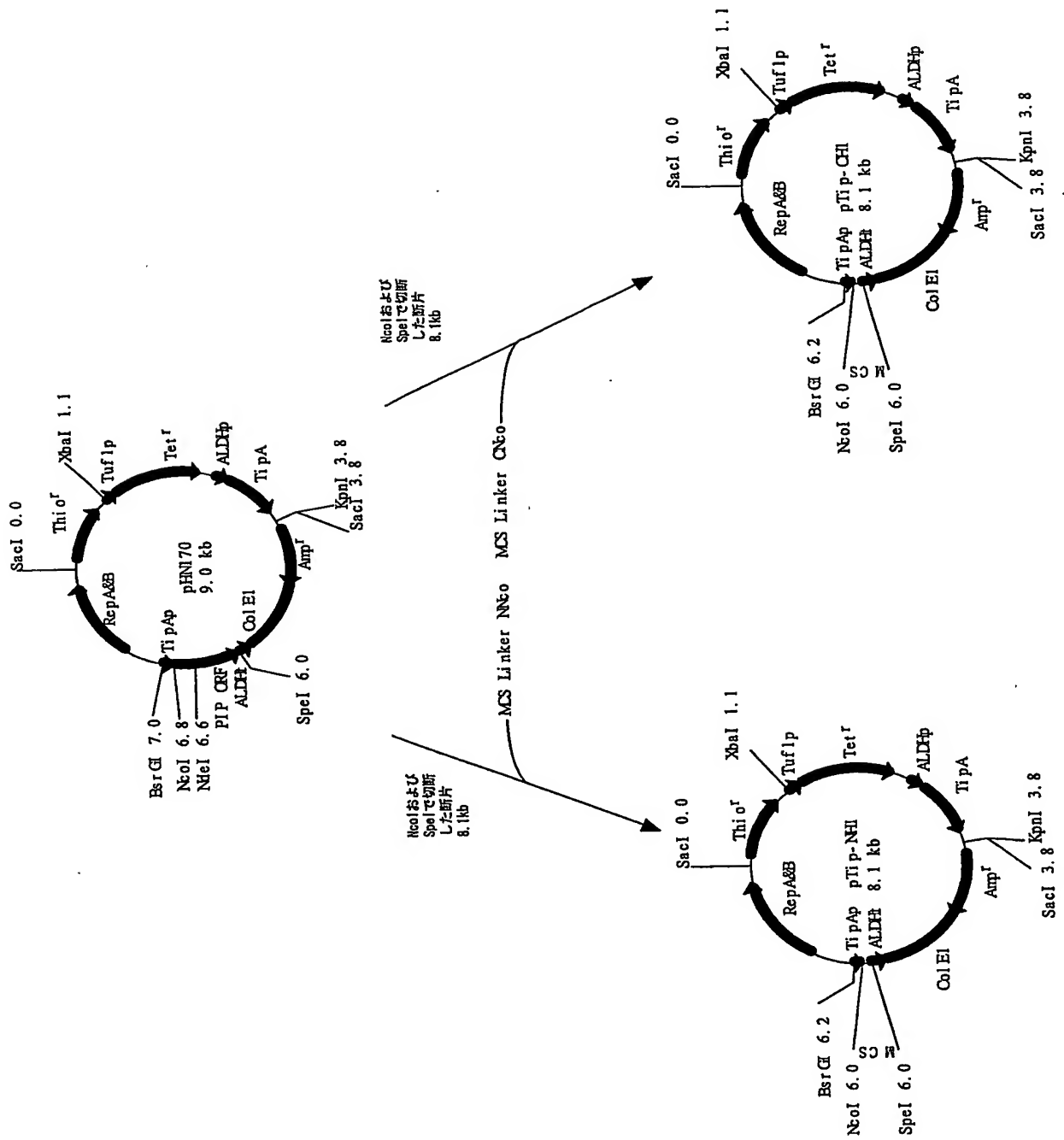


図 6

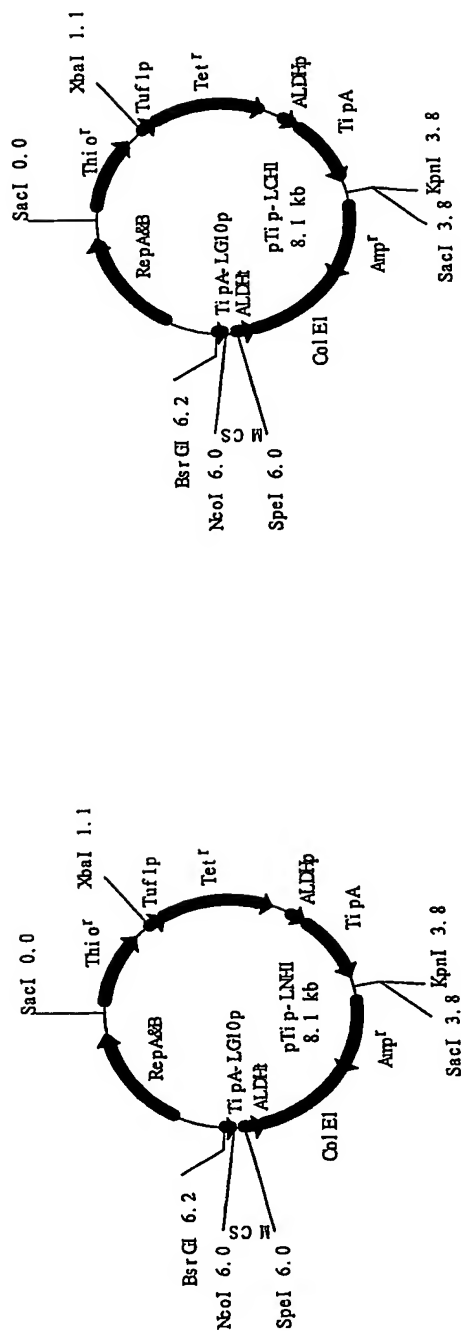
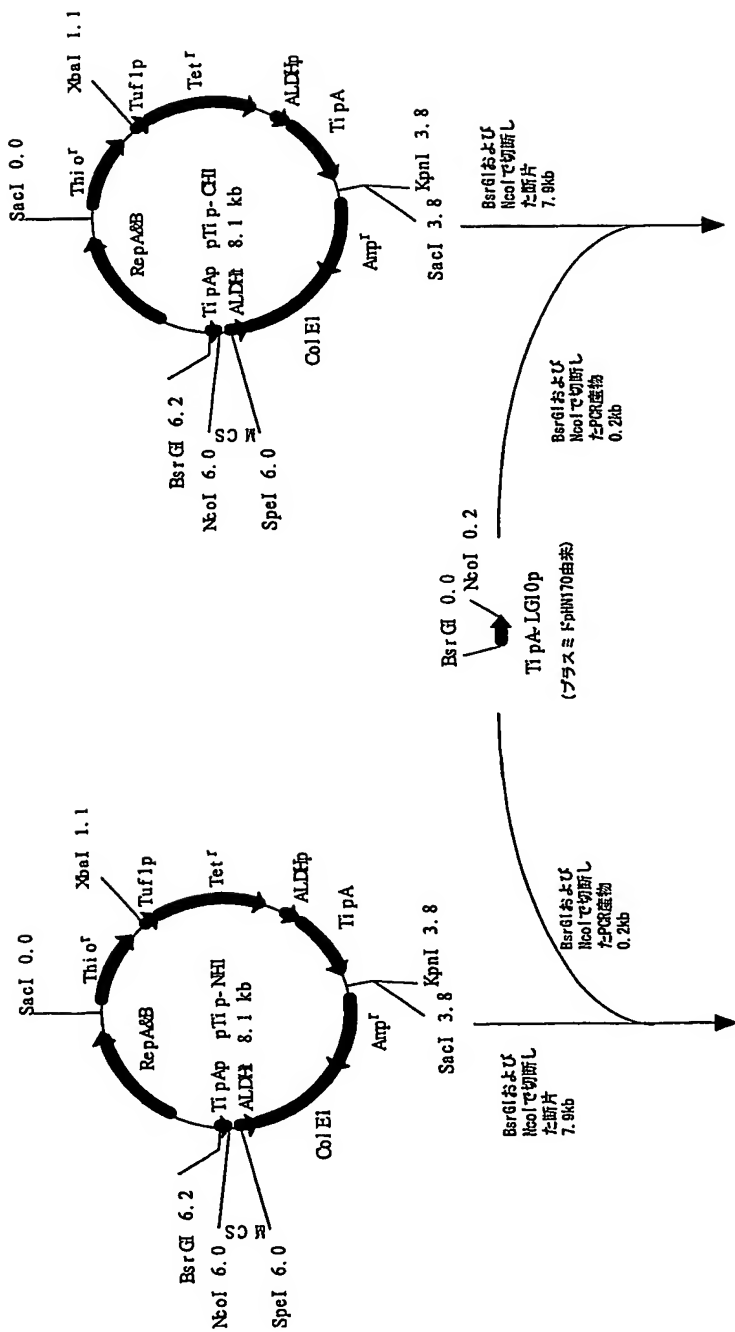


7

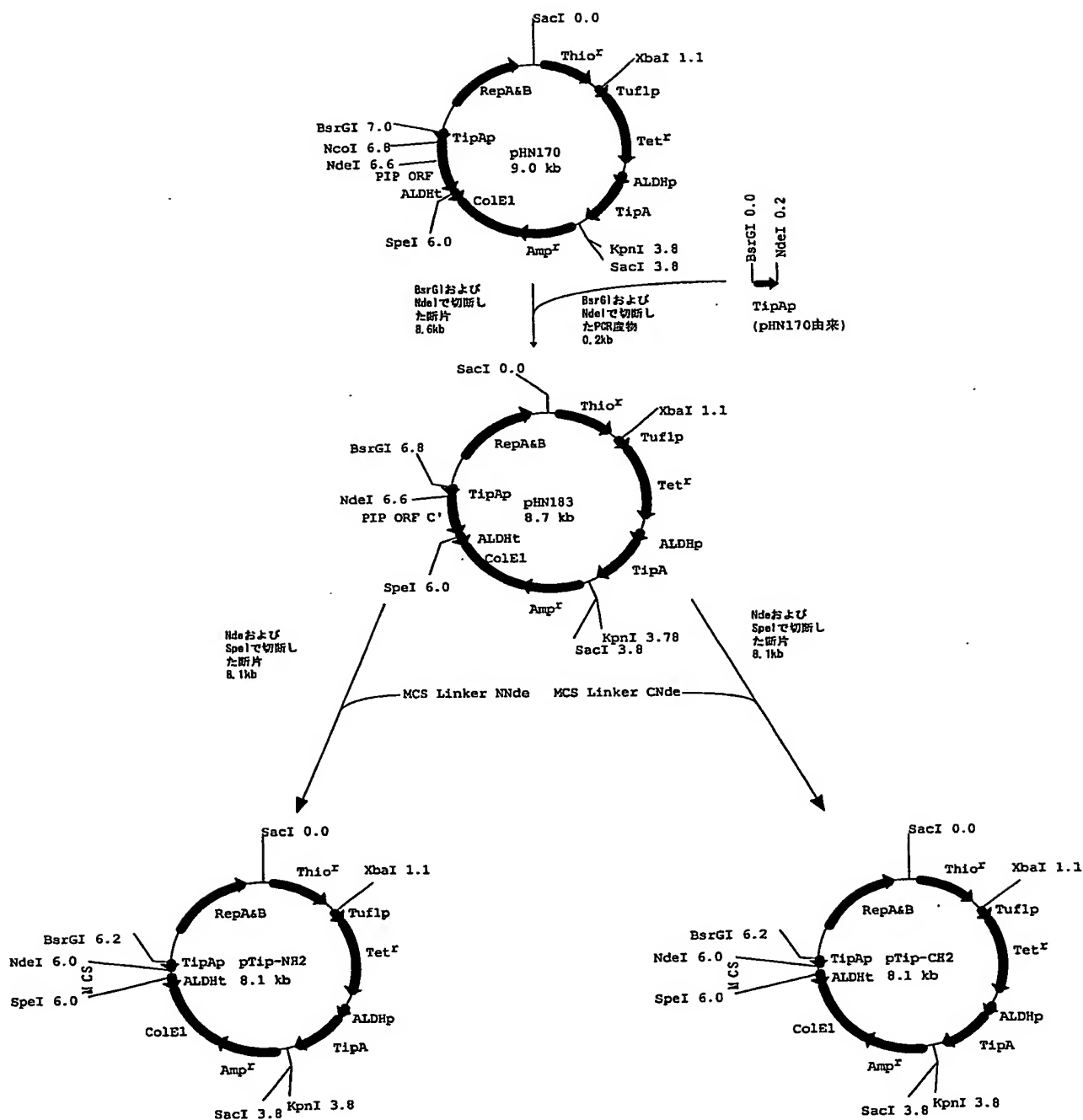




7



## 図 8



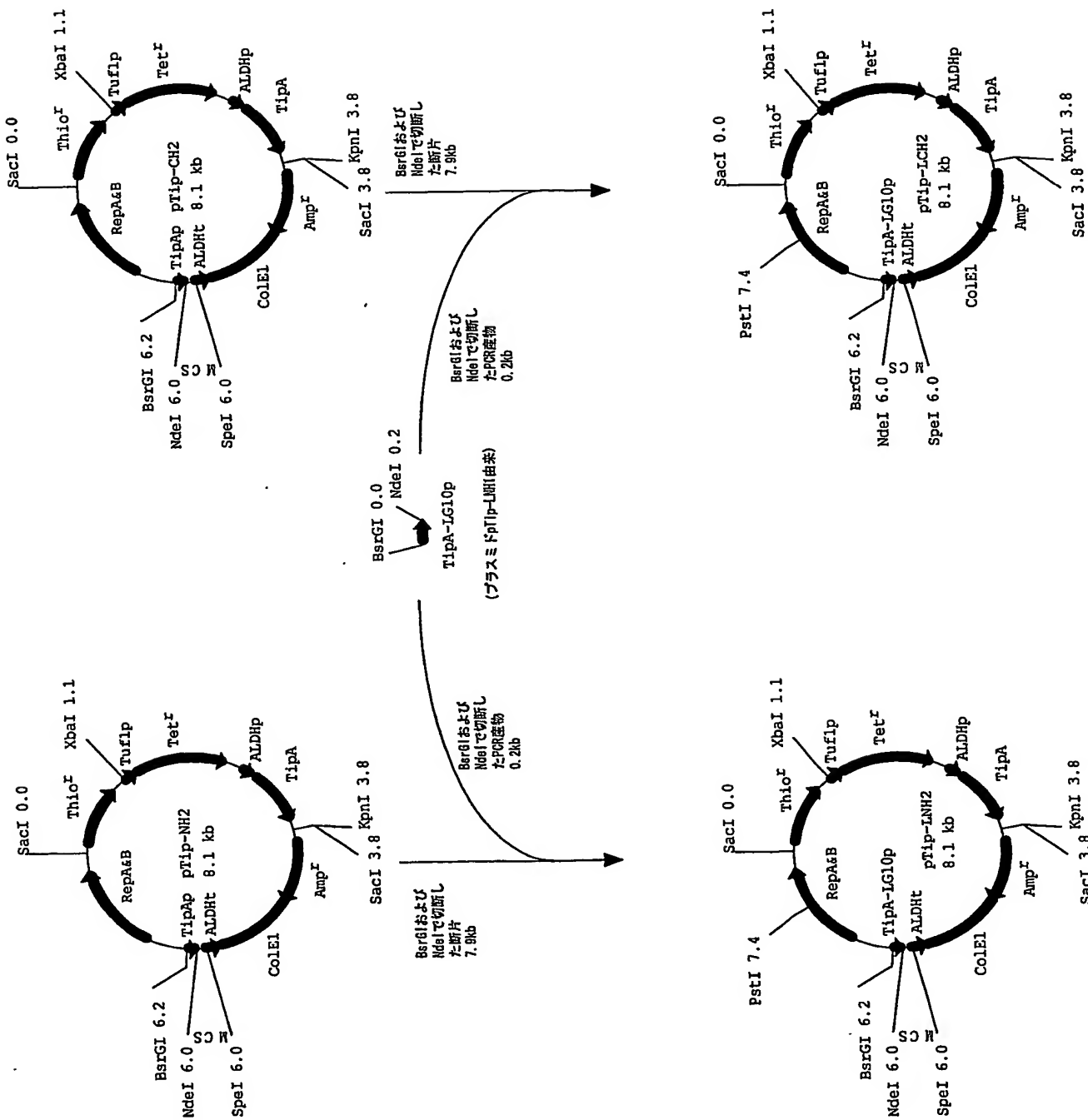
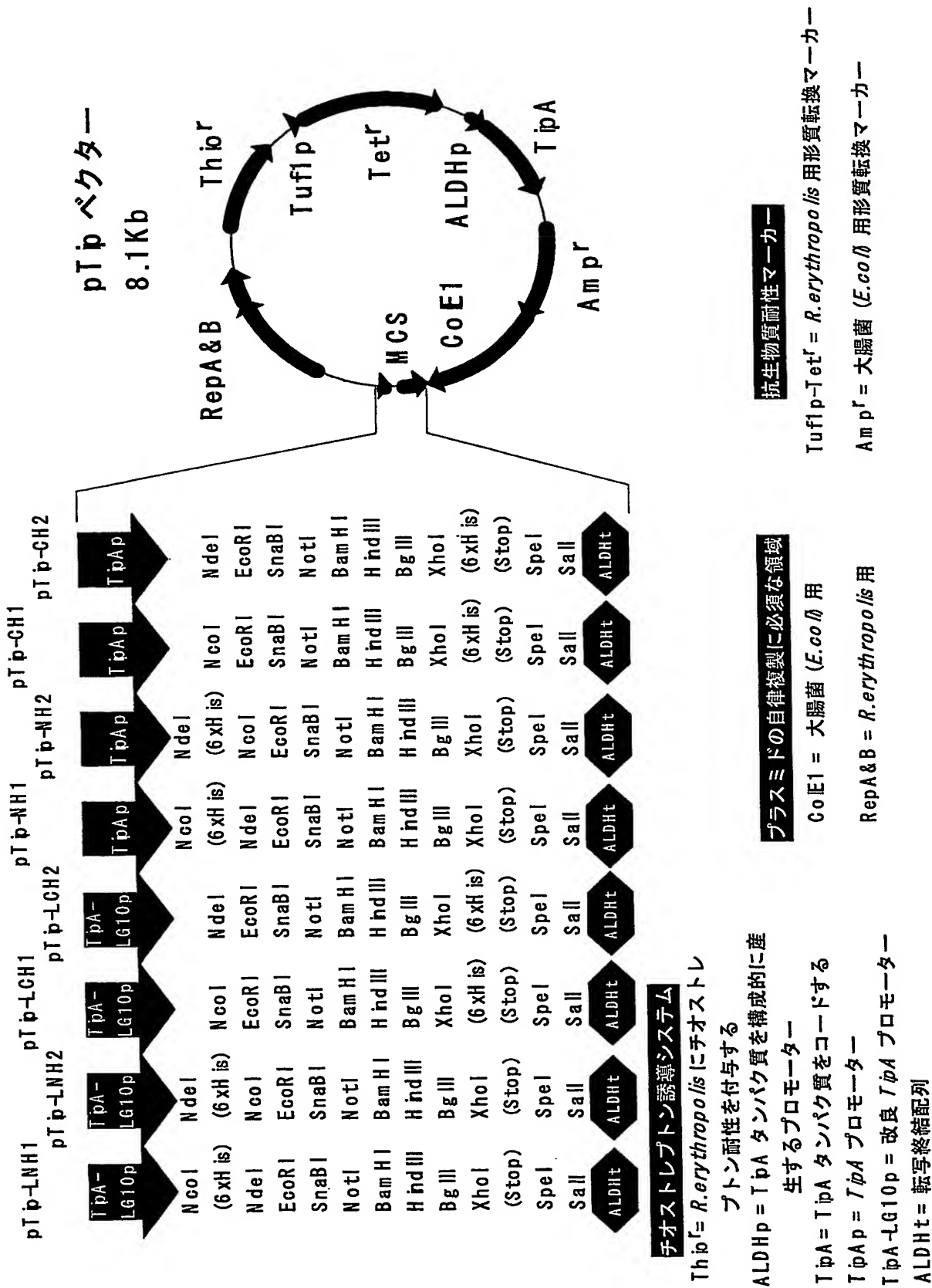
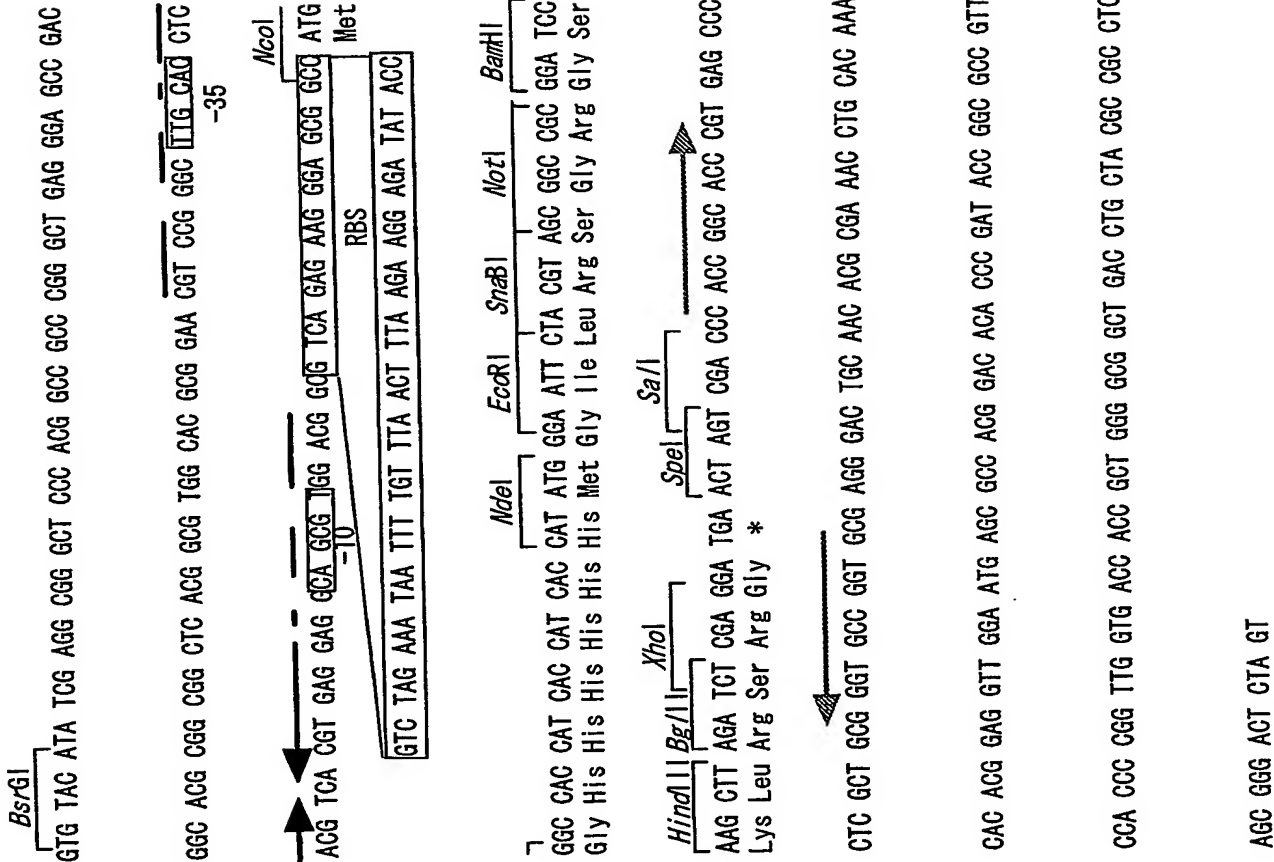


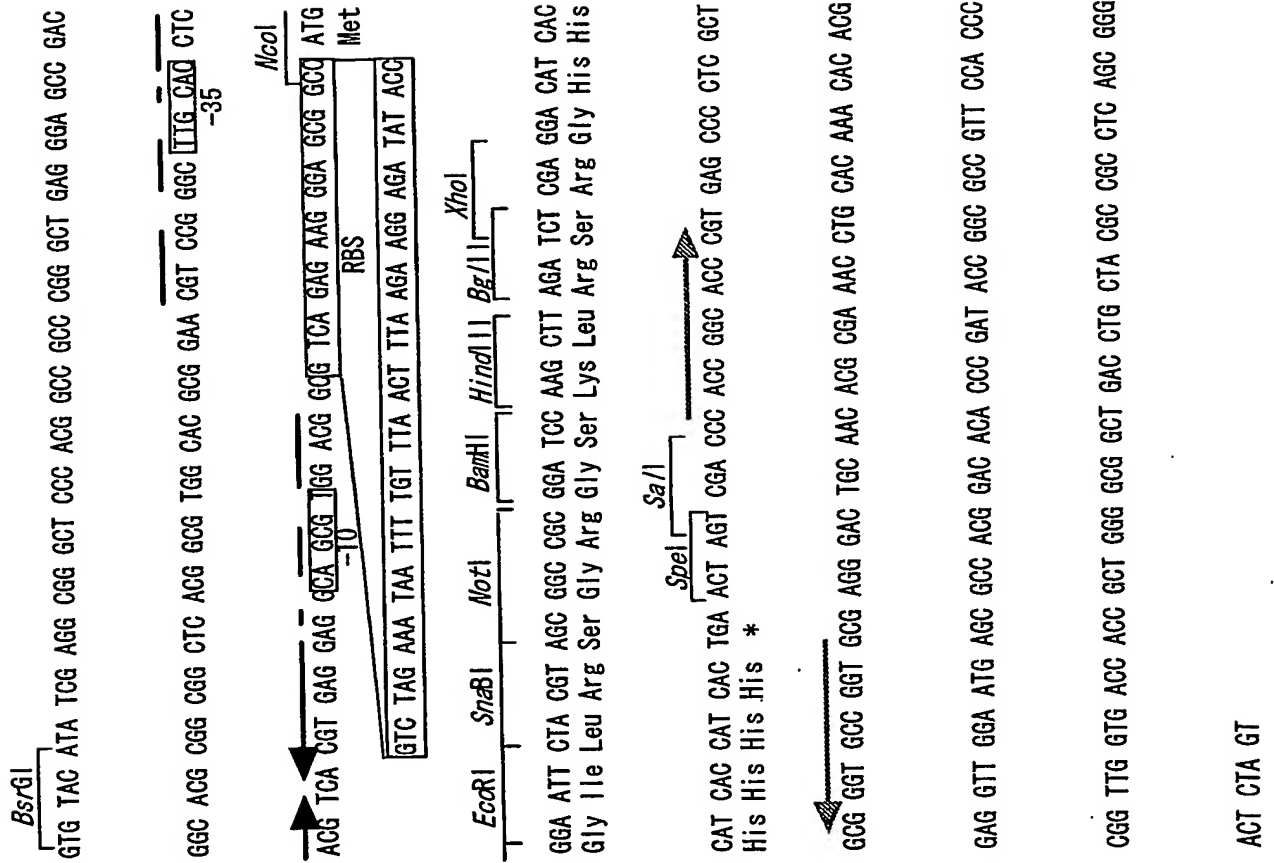
図 9a



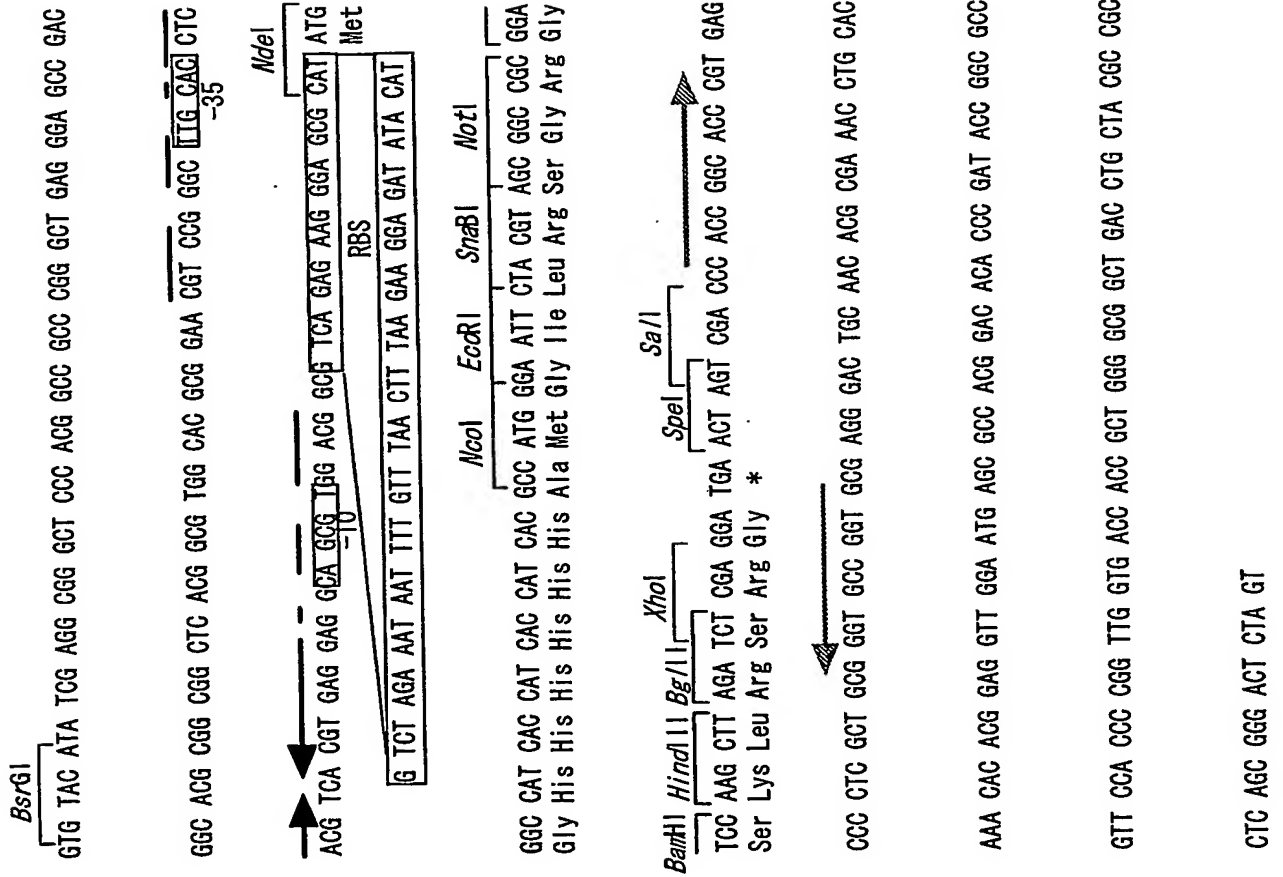
9b



9c



9 d



9 e

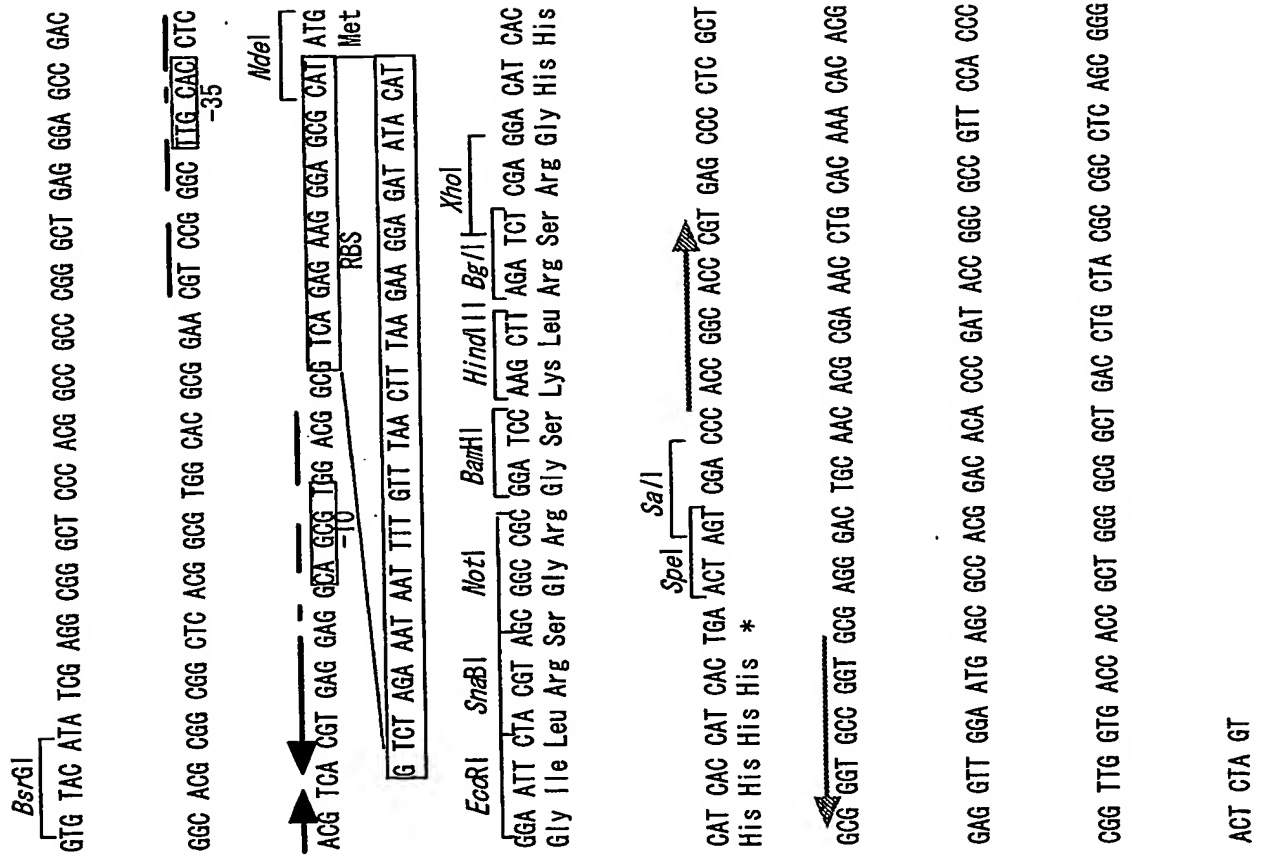






図 11

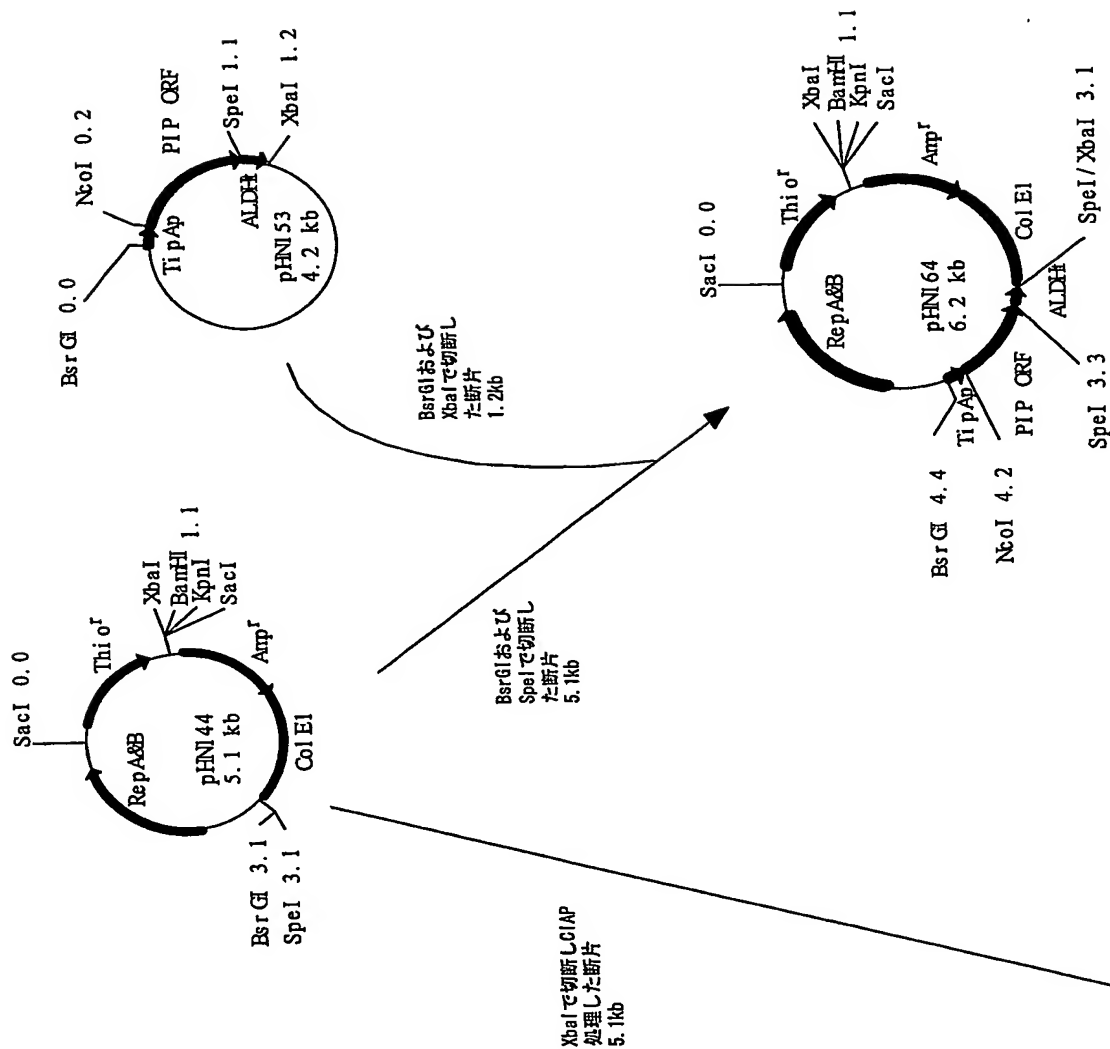


図 1 1

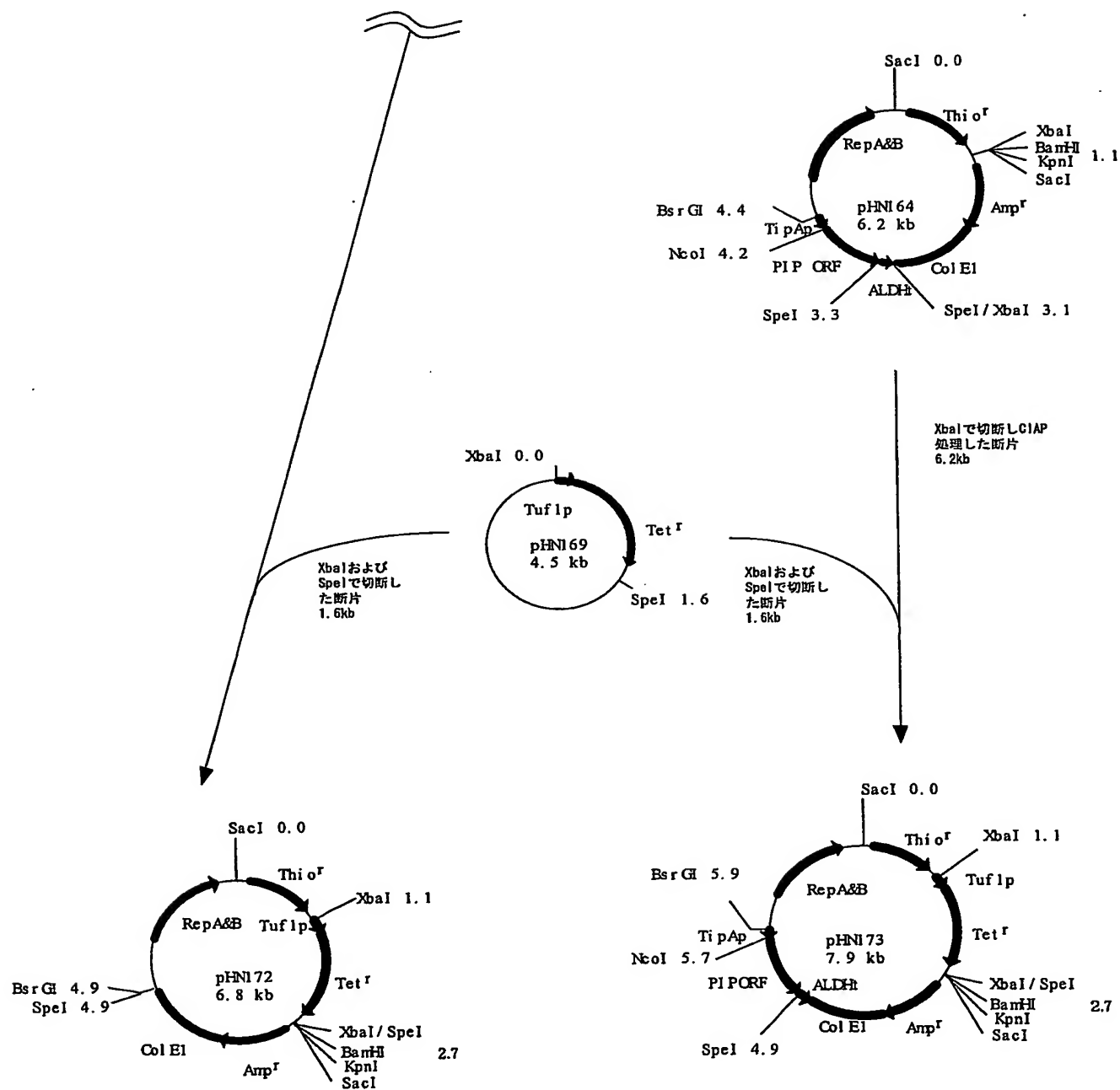


図 12

1μg/ml チオストレプトン	活性 (+/チオストレプトン) (ユニット)	培養温度 (℃)	培養容積 (μl)	<i>R. erythropolis</i> の形質転換に用いた プラスミド	Inducer cassette	Expression cassette
					ALDHp TipA	TipAp PIP ORF ALDHL
+	-				+	+
○	16/0.5	4℃	5	pHN170		
○	0.1/0.2	4℃	5	pHN173	-	+
○	0.1/0.1	4℃	5	pHN172	-	-
○	241/4	30℃	0.5	pHN170	+	+
○	0.9/0.6	30℃	0.5	pHN173	-	+
○	0.3/0.3	30℃	0.5	pHN172	-	-

図 13

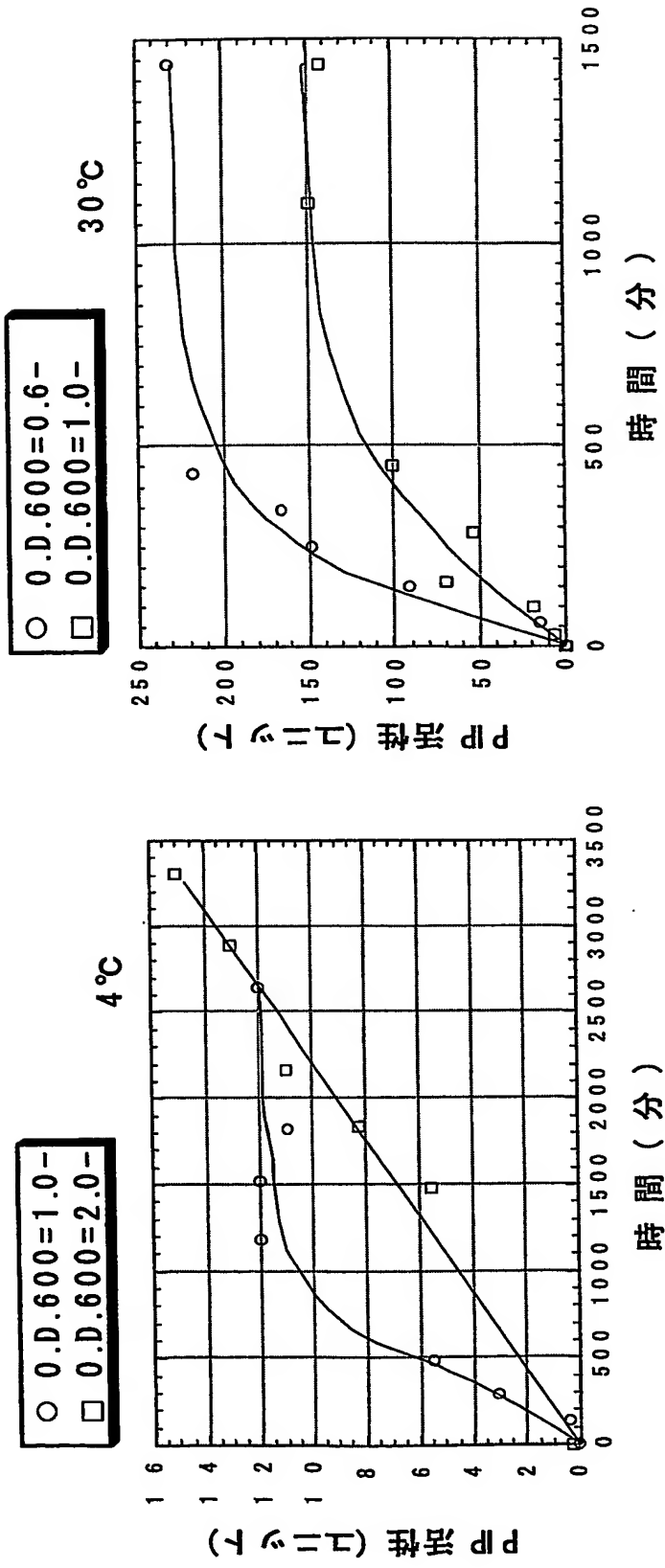


図 14

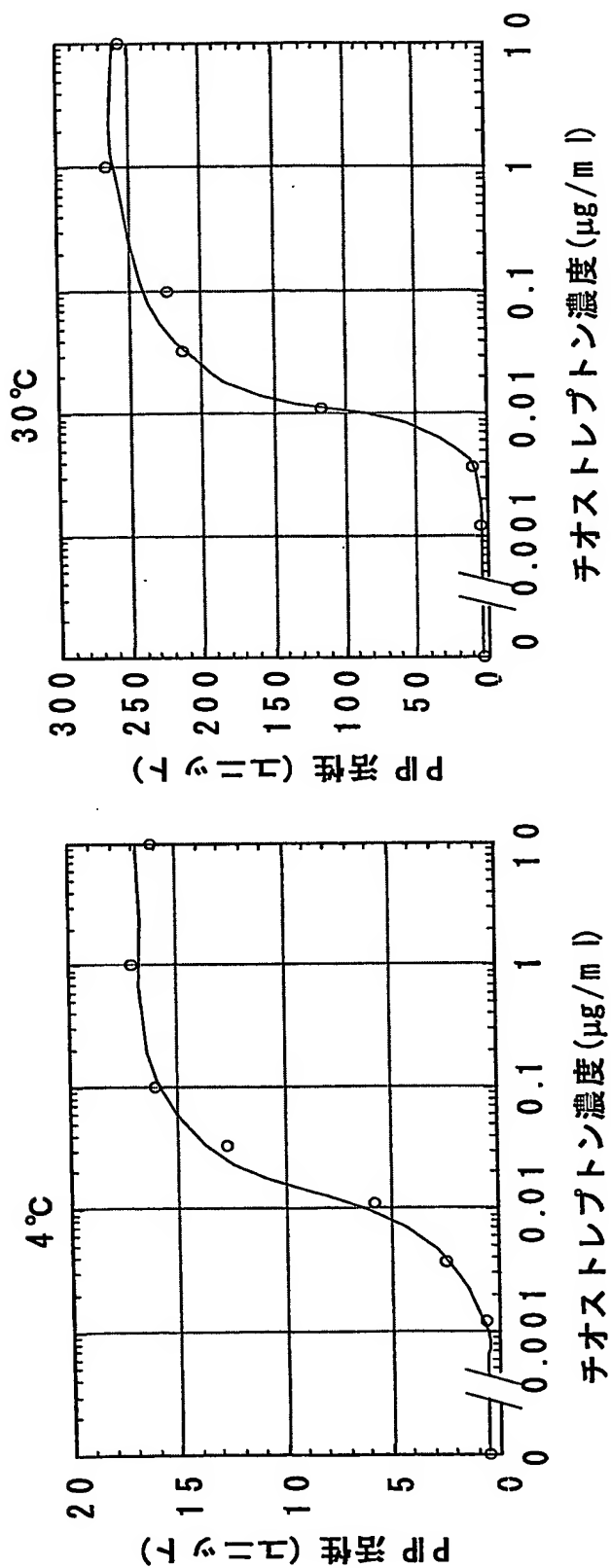


図 15







1μg/ml チオストレプトン	活性 (+/- チオストレプトン) (ユニット)	培養温度 (°C)	pHN170で形質転換された 宿主株	培養容積 (μl)
+	-			
	13/0.8	4°C	<i>R.erythropolis</i>	20
	7/0.8	4°C	<i>R.fascians</i>	20
	1.9/0.3	4°C	<i>R.opacus</i>	100
	215/2	30°C	<i>R.erythropolis</i>	2.5
	34/0.4	30°C	<i>R.fascians</i>	2.5
	6/1	30°C	<i>R.opacus</i>	20

図 16

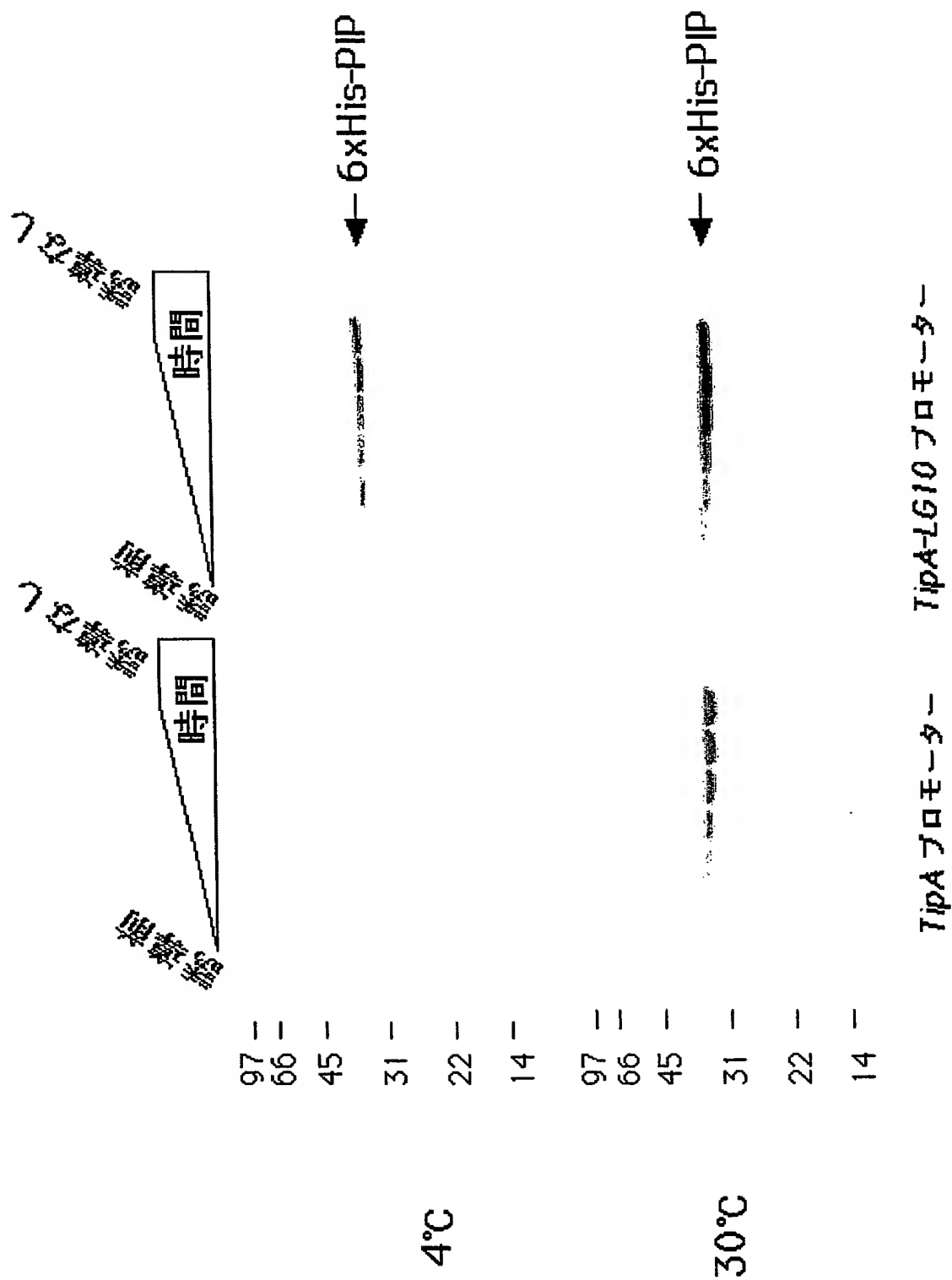
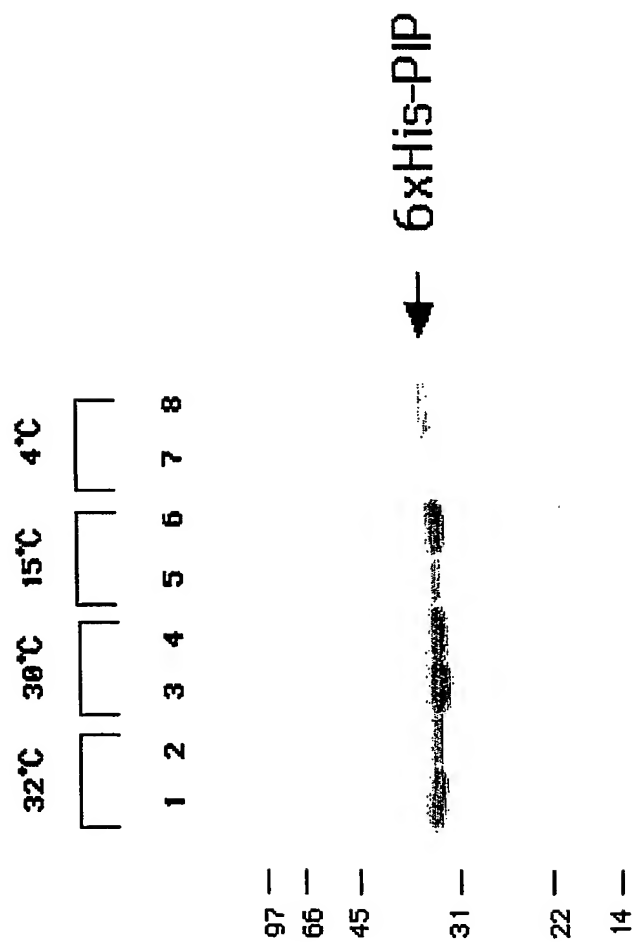




図 17



18

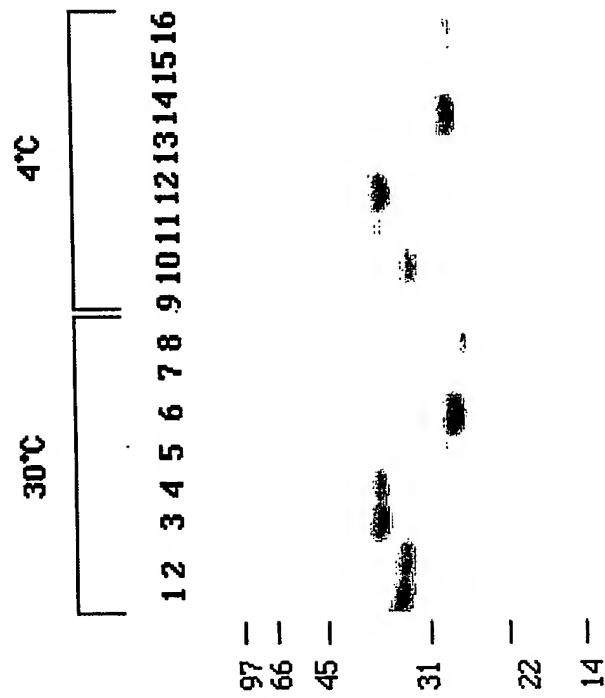


図 19

温度	レポーター	WT	LG10	倍率 (LG10/WT)
30°C	PIP	11	6.3	0.57
	AtPIP	11	4.6	0.39
	GFP	1.1	10	9.1
	GST	0.16	1.3	8.1
4°C	PIP	0.29	2.6	8.9
	AtPIP	0.13	2.9	22
	GFP	<0.01	3.9	>390
	GST	<0.01	1.3	>130

## 図 20

プラスミド名	分類	GenBank 受入番号	種類	数
<b>機能上既知タンパク質 (複数とれたもの)</b>			<b>6</b>	<b>16</b>
LE20	Serum amyloid A (Saa1)	M11131		6
L113	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ 4	BC011114		2
LE59	Pantotenate kinase 1 $\beta$	AF200357		2
LE94	Retinol binding protein 4 (RBP4)	AK008765		2
LE98	Major urinary protein 4 like	BC019965		2
LE287	Histidine-rich glycoprotein	NM_053176		2
<b>機能上既知タンパク質 (複数とれなかったもの)</b>			<b>24</b>	<b>24</b>
L3	Cytochrome b5 like	AK002426		1
LE2	Fibrinogen A alpha	BC005467		1
LE3	Clusterin	NM_013492		1
LE9	Splicing factor 3b subunit 1 155kDa	NM_031179		1
LE12	Haptoglobin	NM_017370		1
LE18	Peroxiredoxin 4	BC019578		1
LE82	Inter-alpha-trypsin inhibitor Heavy Chain 2	NM_010582		1
LE87	RIKEN130000F09, Highly similar to VIP36	NM_025828		1
LE95	Serum albumin	AJ011413		1
LE125	Arylacetate deacetylase	BC019999		1
LE137	New cDNA, Highly similar to UDP-Glycosyltransferase	-		1
LE156	RIKEN1300017J02, Highly similar to Transferrin	AK005035		1
LE171	Phosphatidylinositol 3-kinase	NM_008839		1
LE178	Protein kinase C receptor (RACK1) like	D29802		1
LE204	EGF receptor	AF275367		1
LE247	Retinoic acid receptor responsive protein TIG2	AK002298		1
LE251	Insulin-like growth factor IA	X04480		1
LE280	Transferrin	BC022986		1
LE295	Apolipoprotein A-V	NM_080434		1
LE305	Fatty Acid Binding Protein 1 (FABP1)	BC009812		1
LE354	Retinoblastoma binding protein 7 (Rbbp7)	NM_009031		1
LE357	Zinc fingers and homeoboxes protein 1 (Zhx1)	NM_009572		1
LE416	Tumor differentially expressed 1 like (Tde1l)	NM_019760		1
LE421	RIKEN1300006C19, Highly similar to OSTSTT3	AK018758		1
<b>機能上未知タンパク質</b>			<b>4</b>	<b>4</b>
LE25	IMAGE:4239007, DUF92 like membrane Protein?	BC016895		1
LE51	New cDNA, No homology	-		1
LE119	IMAGE:3489640, Bone marrow stromal protein like?	BC008532		1
LE123	RIKEN1500015G18, No homology	NM_025439		1
<b>小計</b>			<b>34</b>	<b>44</b>
<b>他のタンパク質 (ORF外または重要でないタンパク質)</b>				<b>382</b>
<b>総計</b>				<b>426</b>

図 21

カテゴリー	タンパク質	6xHis タグ	推定 分子量	<i>R. erythropolis</i>			<i>E. coli</i>		
				プラスミド名	30 °C		プラスミド名	30 °C	
					Sup/Ppt	増殖		Sup/Ppt	増殖
スクリーニングにより分離 したタンパク質	Saa1	N'	12 (14)	pHN205	0.4/1	-	pHN193	N.D./N.D.	+-
	NADH4	N'	9	pHN206	N.D./0.2	+	pHN195	N.D./N.D.	++
	Cytochrome b51	N'	15	pHN208	0.2/8	+-	pHN199	N.D./0.8	+
	LE123	N'	19 (21)	pHN287	0.04/0.08	+	pHN276	N.D./N.D.	+-
	Transferrin	N'	75 (77)	pHN289	0.2/0.5	+	pHN277	0.2/0.2	++
	Apoa5	N'	39 (41)	pHN288	3/8	+-	pHN281	N.D./N.D.	+++
	PanK	N'	42				pHN279	2/N.D.	++
	Peroxoredoxin4	N'	27 (31)				pHN278	4/0.4	++
	TFL	N'	75 (77)				pHN280	0.2/0.2	++
不溶性プロテアーゼ	Cathepsin D	C'	43 (45)	pHN270	2/3	++	pHN273	N.D./N.D.	+++
	Prothrombin	C'	30 (70)	pHN271	N.D./N.D.	+-			
	Kallikrein6	C'	26 (29)	pHN272	0.3/0.3	+++	pHN275	N.D./N.D.	+++
DNase	LDNase	N'	36 (33)	pHN299	N.D./N.D.	+			
	DLAD	N'	38 (41)	pHN284	N.D./N.D.	+-			
細胞増殖阻害タンパク質	HMG-1	N'	25	pHN285	4/0.2	-	pHN305	0.2/0.1	-
	Kid1	N'	66	pHN286	N.D./0.08	-			
	Bax alpha	N'	21	pHN217	N.D./N.D.	-	pHN212	N.D./N.D.	-
低温依存的に可溶化される タンパク質	Glucokinase	N'	52	pHN298	4/2	++	pHN306	5/1	+++
	p37A	C'	38	pHN291	4/0.2	+++	pHN308	4/N.D.	+++
ポジティブコントロール	PIP	C'	33	pHN171	6/0.7	+++			
	LacZ	N'	120				pBAD/HisA/lacZ	4/0.5	+++

図 22

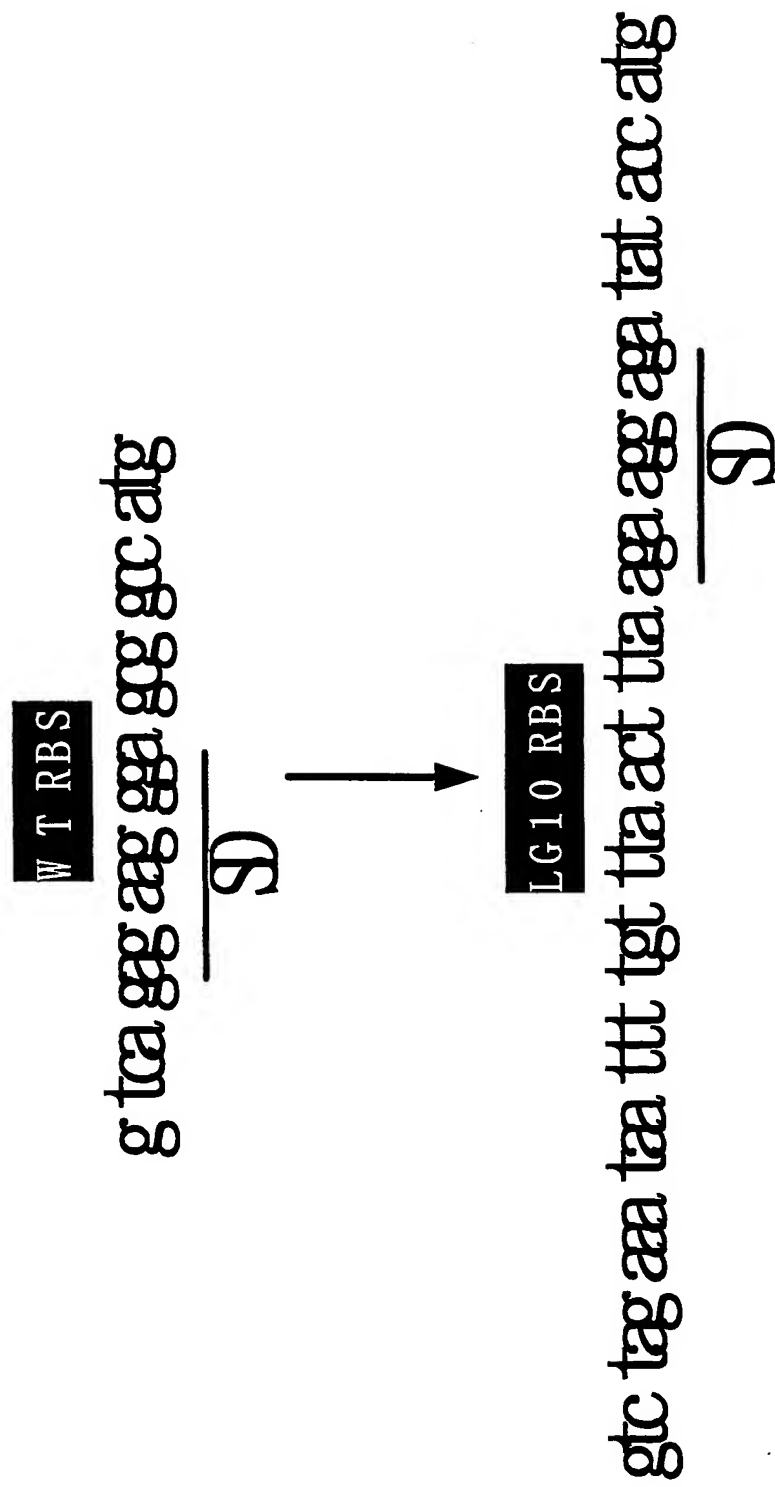
cgccgggctgaggagccgacggcacggcggcggctcac

ggcgtggcacgcgggaacgtccgggcttgacctcacgtc  
 -35

acgtgaggaggcagcgtggacggcgtcagagaaggagc  
 -10 +1 SD

RBS

ggccatg



## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A novel expression vector suitable for the expression at low temperature

<130> PH-1849-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002/235008

<151> 2002-08-12

<160> 113

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN1

<400> 1

cagagctcgt caggtggcac ttttc



<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN2

<400> 2

gttgtacaac tagtcgtgcc agctgcatta

30

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 3

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN121

<400> 4

cggagctctt gaacgagagt tggccgttg

29

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN122

<400> 5

tcagatctat cgtcatcgac tgcgatcacg ttgacgccg

39

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN123

<400> 6

acggatcctc cgctgaaatc tcgccgtgcc t

31

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN130

<400> 7

cttcatatgc ggagctcgac cgcgcggg

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN131

<400> 8

atcgagtcgt tcaagggcgt cggc

24

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1233

<400> 9

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN10

<400> 10

caccaggatg atccccgac

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN11

<400> 11

gacagtgaca tcaccagc

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1224

<400> 12

cgccagggtt ttcccagtica cgac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN40

<400> 13

atgagctact ccgtgggaca ggtg

24

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN41

<400> 14

tgcagatctt ccgtttcgac gtgacggag

29

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN42

<400> 15

cagtctagaa ttgatctcct cgaccg

26

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN43

<400> 16

tgcaagctcc tatgtaaacg

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN55

<400> 17

cgccctgctcc acggccgcc

19

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN56

<400> 18

atggaggcac gcagcatg

18

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN57

<400> 19

cgccccctcg gagtcggcg

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN58

<400> 20

atggacgccg ccgaggac

18

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN147

<400> 21

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca

26

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN39

<400> 22

atccatggcc gtccttct ctgacgccgt c

31

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN36

<400> 23

accatggatc aggaatgcat ag

22

<210> 24

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN37

<400> 24

ttactagttt attaatgatg atgatgatga tgcaggtgtt tcaggatgaa atccgaaag 59

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN6

<400> 25

cgtctagagt cccgctgagg cggcgtagc

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN9

<400> 26

ctactagtcg acccaccggc acccgtgag

29

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN141

<400> 27

aatctagagt aacgggctac tccgtttaac

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN142

<400> 28

gggtcgacgg tcctcctgtg gagtgttct

30

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN145

<400> 29

gcactcgaga tgaaatctaa caatgcgctc atc

33

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN152

<400> 30

agactagtcc tcaacgacag gagcacgatc

30

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7

<400> 31

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN153

<400> 32

aatccacagg acgggtgtgg

20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN154

<400> 33

ctctacgccg gacgcatcg

19

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T3

<400> 34

gcaattaacc ctcactaaag gg

22

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN155

<400> 35

acgacgctct cccttatgcg

20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN156

<400> 36

ccgatgccct tgagagcct

19

<210> 37

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN110

<400> 37

aaccatggta tatctccttc ttaaagttaa acaaaattat ttctagacgc cgtccacgct 60  
gcctcct 67

<210> 38

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco1

<400> 38

catgggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgcg gatccaagct 60  
tagatctcga ggatgaa 77

<210> 39

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco2

<400> 39

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatatgg 60  
tgatggatgat ggtggcc 77

<210> 40

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco1

<400> 40

catgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60  
ccatcactga a 71

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco2

<400> 41

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaatc c 71

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN159

<400> 42

tccatatgcg ctcccttctc tgacgccgt

29

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNdel

<400> 43

tatgggccat caccatcacc atcagccat gggaattcta cgtagcggcc gcggatccaa 60  
gcttagatct cgaggatgaa 80

<210> 44

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNde2

<400> 44

```
ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatggcg 60
tgatggatgat ggtgatggcc ca 82
```

<210> 45

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde1

<400> 45

```
tatgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60
ccatcactga a 71
```

<210> 46

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde2

<400> 46

```
ctagttcagt gatggatgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60
```

cgtagaattc cca

73

<210> 47

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 47

aacatatgta tatctccttc ttaaagttaa ac

32

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN97

<400> 48

ataccatgga acctcatgaa gc

22

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN98

<400> 49

aactcgagat cccataagtg ctttcac ttt

30

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN82

<400> 50

tactcatgat gcatcac cat caccatc

27

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

pTrc99A-Cseq

<400> 51

cagaccgctt ctgcgttctg

20

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN272

<400> 52

atccatggcc cctatactag gttattg

27

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN271

<400> 53

aactcgagtc aatccgattt tggaggatgg tcg

33

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN150

<400> 54

catgggaatt cagatctctc gaga

24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN212

<400> 55

agcttctcga gagatctgaa ttcc

24

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer  
pBAD (Forward)

<400> 56

ctatgccata gcatttttat cc

22

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN166

<400> 57

gccatatggg gtttttttca tttgttcacg

30

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN167

<400> 58

aactcgagtc agtatttgtc aggcagtc

29

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN168

<400> 59

gcctcgaggg gtttttttca tttgttcacg

30

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN169

<400> 60

gaggtacctc agtatattgtc aggcagtcc

29

<210> 61

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN170

<400> 61

cacatatgct ccgccagatc ctctgg

25

<210> 62

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN171

<400> 62

ttgaattcctt agaagtcctgg gccttccttc

30

<210> 63

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN172

<400> 63

ccctcgagat gctccgccag atcctcgg

28

<210> 64

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN177

<400> 64

cccatatggc cgggcagtcg gacaag

26

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN178

<400> 65

gagaattctc aatcttctgc catgtagagg

30

<210> 66

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN179

<400> 66

aactcgagat ggccgggcag tcagacaag

29

<210> 67

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN290

<400> 67

aacatatgaa caagagctct gaagatatcc

30

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN262

<400> 68

atgaattcat ggcaaccatc taactg

26

<210> 69

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN261

<400> 69

ttctcgagaa caagagctct gaagatatcc g

31

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN295

<400> 70

aacatatggc tgtccctgac aaaacggtc

29

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN266

<400> 71

ctaagctttt aatgtttgtg gaaagtgc

28

<210> 72

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN265

<400> 72

gtctcgaggt ccctgacaaa acggtcaaat g

31

<210> 73

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN288

<400> 73

ttccatggca cggaagagcc tctggg

26

<210> 74

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primersHN268

<400> 74

ttgaattcca gacaatgagc tggaggg

27

<210> 75

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN267

<400> 75

aactcgagcg gaagagcctc tgggactac

29

<210> 76

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN243

<400> 76

ctccatgggg attatcagaa tccctctgcg c

31

<210> 77

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN244

<400> 77

agctcgagag agtacgacag cattggcaaa gcc

33

<210> 78

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN245

<400> 78

aacctatgggc accaccgatg cggagttcca cacc

34

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN246

<400> 79

aactcgagat ccaaattgat caatgacttt ctgtatccac

40

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN247

<400> 80

aaccatggga attgttgag gatttaactg tgag

34

<210> 81

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN248

<400> 81

aactcgagag tcattttcag ccatagtttc tcttatcc

38

<210> 82

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN275

<400> 82

aacatatgct gaggctctgc tccttcaatg tgagg

35

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN307

<400> 83

ttctcgagcg tgatacctag gagcg

25

<210> 84

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN277

<400> 84

ggccatgggg acaccagaaa tctcatgc

28

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN278

<400> 85

aagaattcac cgagtcttact tacagaacct

30

<210> 86

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN279R

<400> 86

aacctgggc aaaggagatc ctaagaag

28



<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN280

<400> 87

ttgaattcct gcgctagaac caacttattc atc

33

<210> 88

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN314

<400> 88

aactcgaggg caaaggagat cctaagaag

29

<210> 89

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN283

<400> 89

gaccatggct cctgagcaat gggaag

26

<210> 90

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN284

<400> 90

ataagctttt aagggtcctc atccacgtga a

31

<210> 91

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN164

<400> 91

aacatatgga cgggtccggg gagcag

26

<210> 92

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN194

<400> 92

aagaattctc agcccatctt cttccagatg

30

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN193

<400> 93

aactcgagat ggacgggtcc ggggagca

28

<210> 94

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN305

<400> 94

ctcatatggc tgtggatact acaagg

26

<210> 95

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN306

<400> 95

atctcgagga ttctactggc ccagcatgc

29

<210> 96

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN296

<400> 96

aactcgagcg tcggtatcct ttttgcgctg

30

<210> 97

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN330

<400> 97

acccatgggc gacggtgctg gaaattg

27

<210> 98

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN259

<400> 98

aactcgagat gaagcttgta aatggcagaa ag

32

<210> 99

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN260

<400> 99

aagaattcct ctactgtgta tcggtcat

28

<210> 100

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN269

<400> 100

aactcgagct gcaaggcttg gagagtgatg

30

<210> 101

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN270

<400> 101

gaggtacctt tcagtttagc ttgtcgaaat ac

32

<210> 102

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN263

<400> 102

gcctcgagct tcctgagaag accatacgat g

31

<210> 103

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN264

<400> 103

ctgaattctg tttaatatatt atgaaatgtg

30

<210> 104

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN343

<400> 104

aaactagttc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc t

41

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7 Universal

<400> 105

taatacgact cactataggg

20

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 8166

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH1

&lt;400&gt; 106

```
gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcctcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgagc cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tticcgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa agggctggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtccttc aacgtttccg tticcctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcttc gacctcgatt 1020
```



cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcacitcc tcgaaggcgc ggccgacgcc ctigaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc cttgatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgcctgcttc 1560  
gctacttga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcctcgttg cggcattcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcacgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgig ggtatggttg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgcgga cgatgatcgg cctgtcgtt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccitcg tcaactggtc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcg cgcacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacatc ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggtt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760

gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggctt tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtcgaag gagaagaccg 3360  
cctcgtaac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggctt cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgtt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttgtctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggatgcagc gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gtcttgctat gtggcgcggt attatccgtt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgccca 4320  
taacatgag tgataaacct gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500

caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacitac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc giatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tgcgtgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccctt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggctgggtt ttigccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatactcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtccctgtcg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcatthaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtagaacg 5880  
gcgccgggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060  
tggtgatggt gatggtggcc catggccgct cccttctctg acgccgtcca cgctgcctcc 6120  
tcacgtgacg tgaggigcaa gcccgagcgt tccgcgtgcc acgccgtgag ccgccgcgtg 6180  
ccgtcggctc cctcagcccc ggccggccgtg ggagccccgc tcgatatgta cacccgagaa 6240

gctcccagcg tcttcctggg ccgcgatact cgaccaccac gcacgcacac cgcactaacg 6300  
attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg 6360  
ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccga gcagaagagt gaacaaccac cgaccacgct 6420  
tccgctctgc gcgccgtacc cgacctacct cccgcagctc gaagcagctc ccgggagtac 6480  
cgccgtactc acccgctgt gctcaccatc caccgacgca aagcccaacc cgagcacacc 6540  
tcttgcacca aggtgccgac cgtggctttc cgctcgcagg gttccagaag aaatcgaacg 6600  
atccagcgcg gcaaggttca aaaagcaggg gttgggtggg aggaggtttt ggggggtgtc 6660  
gccgggatac ctgatatggc ttgtttttgc gtagtcgaat aattttccat atagcctcgg 6720  
cgcgctggac tcgaatagtt gatgtggcg ggacagttg ccccatgaaa tccgcaacgg 6780  
ggggcggtgt gagcgatcgg caatgggcgg atgcggtgtt gcttccgcac cggccgttcg 6840  
cgacgaacaa cctccaacga ggtcagtacc ggatgagccg cgacgacgca ttggcaatgc 6900  
ggtacgtcga gcattcaccg cagcggttgc tcggaictat cgtcatcgac tgcgatcacg 6960  
ttgacgccgc gatgcgcgca ttcgagcaac catccgacca tccggcgccg aactgggtcg 7020  
cacaatcgcc gtccggccgc gcacacatcg gatgggtggct cggccccaac cacgtgtgcc 7080  
gcaccgacag cgcccgactg acgccactgc gctacgcca ccgcatcgaa accggcctca 7140  
agatcagcgt cggcgcgat ttcgcgtatg gcgggcaact gacaaaaaac ccgattcacc 7200  
ccgattggga gacgatctac ggcccggcca ccccgtaac attgcggcag ctggccacca 7260  
tccacacacc ccggcagatg ccgcgtcggc ccgatcgggc cgtgggcctg ggccgcaacg 7320  
tcaccatgtt cgacgccacc cggcgatggg catacccgca gtgggtggaa caccgaaacg 7380  
gaaccggccg cgactgggac catctcgtcc tgcagcactg ccacgccgtc aacaccgagt 7440  
tcacgacacc actgccgttc accgaagtac gcgccaccgc gcaatccatc tccaaatgga 7500  
tctggcgcaa ttccaccgaa gaacagtacc gagcccgaca agcgcatctc ggtcaaaaag 7560  
gcggaagggc aacgacactc gccaaacaag aagccgtccg aaacaatgca agaaagtacg 7620  
acgaacatac gatgcgagag gcgattatct gatgggcgga gccaaaaatc cgggtgcgccg 7680  
aaagatgacg gcagcagcag cagccgaaaa attcgggtgc tccactcgca caatccaacg 7740  
cttgtttgtt gagccgcgtg acgattacct cggccgttcg aaagctcgcc gtgacaaagc 7800  
tgtcgagctg cggaagcagg ggttgaagta ccgggaaatc gccgaagcga tggaaactctc 7860  
gaccgggatac gtcggccgat tactgcacga cgcccgagg cagggcgaga tticagcgga 7920  
ggatctgtcg gcgtaaccaa gtcagcgggt tgtcgggttc cggccggcgc tcggcactcg 7980

gaccggccgg cggatggigt tcigcctctg ggcagcgtc agctaccgcc gaaggcctgt 8040  
catcgaccgg cttcgactga agtatgagca acgtcacagc ctgtgatagg atgatccgt 8100  
cacgctcgac cgctacctgt tcagctgccg cccgctgggc atgagcaacg gccaaactctc 8160  
gttcaa 8166

<210> 107

<211> 8169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH2

<400> 107

gagctcgacc ggcggggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccctt cggttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctg cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctc tgcacagcat 300  
cgcgggccgg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgagc cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccct 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttcccgigaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctgtcgtttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtccttc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960

tctcgcggcc aaccgataag cgcctctggt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggiccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggtaactgc gggcctcttg cgggataatc tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgcataat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcaccggtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cggccagtc tgcctgcctc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgttgattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgttg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccca 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcggtg ggtatggttg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttcccttgcg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccgggtgg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggctgc ggacgcgtc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgcg ccatgatcgg cctgtcgtt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgt caagccttcg tcaactgttc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgttcc ggcggcacgc ggaatgccgc 2280  
gttgcaggcc atgtgttcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700

atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgittctcgc acgcaacgta ctigcaacgt tgcaactcct agtgttgiga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgatit ggtaggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggctt tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cctttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttgtctacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtagcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcgggt attatccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggaatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaacgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac 4440

cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaaacta ttaacitggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tgcctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gatlgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgtttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgccttg tatctttata gtccctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttccctg gccttttgct ggcccttttg tccatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtag tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagtgc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccatg 6060  
gcgtgatggt gatggtagtg gcccatatgc gctcccttct ctgacgccgt ccacgctgcc 6120  
tcttcacgtg acgtgagggt caagcccga cgttccgcgt gccacgccgt gagccgccgc 6180



gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc gcctcgatat gtacacccga 6240  
gaagctccca gcgtcctcct gggccgcgat actcgaccac cacgcacgca caccgcacta 6300  
acgattcggc cggcgctcga ttggccggc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg 6360  
gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac 6420  
gcttcgctc tgcgcgccgt acccgacctt cctcccgag ctggaagcag ctcccgaggag 6480  
taccgccgta ctacccgcc tgtgtcacc atccaccgac gcaaagccca acccgagcac 6540  
acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc agggttccag aagaaatcga 6600  
acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg gggaggaggt ttgggggggt 6660  
gtgcccgga tacttgatat ggctttgttt tgcgtagtcg aataattttc catatagcct 6720  
cggcgcgctc gactcgaata gtgatgttg gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa 6780  
cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcggt gttgcttccg caccggccgt 6840  
tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt accggatgag ccgcgacgac gcattggcaa 6900  
tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcgatc tatcgicac gactgcgac 6960  
acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg 7020  
tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatgggt gctcggcccc aaccacgtgt 7080  
gccgcaccga cagcgcccga ctgacgccac tgcgtacgc ccaccgcac gaaaccggcc 7140  
tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgctg atggcgggca actgaccaa aaccgattc 7200  
accccgattg ggagacgatc tacggcccgg ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca 7260  
ccatccacac accccggcag atgccgcgtc ggcccgatcg ggccgtgggc ctgggcccga 7320  
acgtcaccat gttcgacgcc acccggcgat gggcataccc gcagtgggtg caacaccgaa 7380  
acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctc tcttcagca ctgccacgcc gtcaacaccg 7440  
agttcacgac accactgccg ttaccgaag tacgcgccac cgcgcaatcc atctccaaat 7500  
ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg acaagcgcat ctcggtcaaa 7560  
aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcctaaac aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt 7620  
acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc ggagccaaaa atccggtgcg 7680  
ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcgtt gcctccactc gcacaatcca 7740  
acgttggttt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt gcgaaagctc gccgtgacaa 7800  
agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa atcgccgaag cgatggaact 7860  
ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacgccgcg aggcacggcg agatttcagc 7920

ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg ggttgtcggg ticcggccgg cgctcggcac 7980  
tcggaccggc cggcggatgg tgttctgcct ctggcgcagc gtcagctacc gccgaaggcc 8040  
tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac agcctgtgat tggatgatcc 8100  
gtcacgctc gaccgctacc tgttcagctg ccgcccgtg ggcatgagca acggccaact 8160  
ctcgttcaa 8169

<210> 108

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-CH1

<400> 108

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccctt cggttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccica tgcacagcat 300  
cgcgcccgga gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa agggctgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900

cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cagagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcgcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gaitcacctca cagggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtcggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc ctigaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggtagtgc ggccctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgttg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccactctctt 1800  
gcatgcacca ttcttgcg cggcgggtgt caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgat cccttgagag ccttcaacct 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgt gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgt caagccttcg tcaactggtc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcgcatcg ggatgccgcg 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640

tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgtttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgacggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgcctg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggctt tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgcctg gggaacaccg acgcctaccg ccagtcgaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtg ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtg cgcccttatt cctttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttigtctacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gtctctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380

agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacitac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccitt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggtggtttg ttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg gggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttggga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc cgctcccttc tctgacgccg tccacgctgc ctctcacgt 6120

gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180  
gtccctcag cccgggaggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacacccg agaagctccc 6240  
agcgtcctcc tgggccgga tactcgacca ccacgcacgc acaccgact aacgattcgg 6300  
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgaltc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360  
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420  
ctgcgcgccg taccgacct acctcccgca gctcgaagca gctcccgga gtaccgccgt 6480  
actacccgc ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540  
accaaggtgc cgaccgtggc ttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600  
cgcggaagg ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg tttgggggg tgtcgccggg 6660  
atacctgata tggctttgtt ttgcgtagtc gaataatitt ccatatagcc tcggcgcgtc 6720  
ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780  
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840  
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcatlggca atgcggtacg 6900  
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcgat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg 6960  
ccgcgatgcg cgcatlccag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020  
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatggg ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080  
acagcgcccg actgacgcca ctgcgtacg cccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca 7140  
gcgtcggcgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccctgatt 7200  
gggagacgat ctacggcccg gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260  
caccctggca gatgccgct cgcccgatc gggccgtggg cctgggcccg aacgtcacca 7320  
tgttcgacgc caccggcga tgggcatacc cgcagtggg gcaacaccga aacggaaccg 7380  
gccgcgactg ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440  
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc 7500  
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcgggtcaa aaaggcggca 7560  
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620  
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680  
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttgtt 7740  
tgctgagccg cgtgacgatt acctcggccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800  
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860

gatcgtcggc cgattactgc acgacgcccg caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920  
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gtcccgccg gcgctcggca ctccgaccgg 7980  
ccggcggaig gtgttctgcc tctggcgcag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040  
ccggcttcga ctgaagtaig agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgct 8100  
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 109

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-CH2

<400> 109

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccgg gtggagttca tgcaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tticcgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggtggc cttgctgttc ggcagcgaaa agggtagggc 840

ttccgacctg ttccgaggagg cgtcttccgc ctccggtttcc atccccaatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcttc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctccgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cggccagtcc tgcctcgctc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg' ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggcctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgctg ggtatgggtg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttcccttgcg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacce 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcatit tcggcgagga 2040  
ccgttttcgc tggagcgcg ccatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggccggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580



cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatcig cgtttctcgc acgcaacgta ctgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggt gggatigcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggctt tggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtcgaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgc accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttigtctacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggcgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gtcttgctat gtggcgcgggt attatccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320

taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg aicatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg- tgggtctcg ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccitt ttttctgcg gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggtggtttg ttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgaggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtattt ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagctcag tgagcgagga agcgggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtagaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggitt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatggg atggtgatgt cctcgagatc taagcttggg tccgcggccg 6060

ctacgtagaa ttcccatatg cgctcccttc tctgacgccg tccacgctgc ctcctcacgt 6120  
gacgtgaggt gcaagcccg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180  
gctccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgcttcgata tgtacacccg agaagctccc 6240  
agcgtcctcc tgggccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgcaat aacgattcgg 6300  
ccggcgctcg attcgcccg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360  
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420  
ctgcgcgccg taccgacct acctcccgca gctcgaagca gctcccgga gtaccgccgt 6480  
actcaccgc ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540  
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600  
cgcggaagg ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg ttttgggggg tgtcgccggg 6660  
atacctgata tggctttgtt ttgcgtagtc gaataatctt ccatatagcc tcggcgcgtc 6720  
ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780  
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840  
acaacctcca acgaggtcag taccgatga gccgcgacga cgcatcggca atgcggtacg 6900  
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcgat ctatcgatc cgactcgat cacgttgacg 6960  
ccgcgatgcg cgcatcag caaccatccg accatccggc gccgaactgg tcgcgacaa 7020  
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatggg ggctcgccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080  
acagcgcccg actgacgcca ctgcgctacg cccaccgat cgaaaccggc ctcaagatca 7140  
gcgtcgggcg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccctgatt 7200  
gggagacgat ctacggcccg gccaccccg acacattcg gcagctggcc accatccaca 7260  
caccctggca gatccgcgt cggcccgatc gggccgtggg cctgggcccg aacgtcacca 7320  
tgttcgacgc caccggcga tgggcatacc cgcatgggt gcaacaccga aacggaaccg 7380  
gccgcgactg ggaccatctc gtcttcgac actgccacgc cgtcaacacc gatttcacga 7440  
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaat catctccaaa tggatctggc 7500  
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcggtcaa aaaggcgga 7560  
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620  
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680  
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgccctccat cgcacaatcc aacgcttgtt 7740  
tgctgagccg cgtgacgatt acctcgccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800

gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860  
gatcgtcggc cgattactgc acgacgcccg caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920  
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gticcggccg gcgctcggca ctcgaccgg 7980  
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgcag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040  
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgac cgctcacgct 8100  
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 110

<211> 8189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LNH1

<400> 110

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccitca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720

cattcgggac agcggatatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tticcgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctigctgttc ggcagcgaaa agggtagggc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttcgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgccctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtcgggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc ctigaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggccctctg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgcctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcaccggtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgcctgcctc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcactgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttcccttgcg cggcgggtgt caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacct 1920  
agtcagctcc ttccgggtgg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgcg cgaatgatcg cctgtcgtt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgtc caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgcg 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460

tgtctgccctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgtttgta 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgcctg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atgcgccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtc ccacgtccgc cgctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcatittg ccttcctgtt ttgtctacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggcgcagc gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gtctcgtat gtggcgcggt attatccgt attgacgccg 4200

ggcaagagca actcggtcgc cgcatatact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taacatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cagcatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggcttggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gatigattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttccig gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccttga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagctcag tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtaggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgttggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940

cgcggtgttc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060  
tggtgatggg gatgggtggc catggtatat ctcccttcta aagttaaaca aaattatitc 6120  
tagacgccgt ccacgctgcc tctcacgtg acgtgagggt caagcccga cgttcgcgt 6180  
gccacgccgt gagccggcg gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc 6240  
gcctcgatat gtacaccga gaagctccca gcgtcctcct gggccgcgat actcgaccac 6300  
cacgcacga caccgcacta acgattcggc cggcgctcga ttggccggc gctcgattcg 6360  
gccggcgctc gattcggccg gcgtcgtatt cggccggcg tcgattcggc cgagcagaag 6420  
agtgaacaac caccgaccac gcttcgcgtc tgcgcgccgt acccgacct cctccgcag 6480  
ctcgaagcag ctcccgggag taccgccgt ctcaccgcc tgtgctcacc atccaccgac 6540  
gcaaagccca acccgagcac acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc 6600  
agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaagg tcaaaaagca ggggttgggt 6660  
gggaggagggt ttgggggggt gtcgccggga tactgatat ggctttgttt tgcgtagtcg 6720  
aataatitc catatagcct cggcgcgtcg gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag 6780  
ttgccccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcgt 6840  
gttgcttccg caccggccgt tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt accggatgag 6900  
ccgcgacgac gcattggcaa tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc 6960  
tatcgtcatc gactgcgac acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga 7020  
ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatgggt 7080  
gctcggcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcggccga ctgacgccac tgcgctacgc 7140  
ccaccgcac gaaaccggcc tcaagatcag cgtcggcgcc gatttcgcgt atggcgggca 7200  
actgacaaa aaccgattc acccgattg ggagacgac tacggcccgg ccaccccgta 7260  
cacattgcgg cagctggcca ccatccacac accccggcag atgccgcgt ggcccgatcg 7320  
ggccgtgggc ctggggcgca acgtcacat gttcgacgc acccgcgat gggcataccc 7380  
gcagtgggtg caacaccga acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca 7440  
ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgcc ttaccgaag tacgcgccac 7500  
cgcgcaatc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg 7560  
acaagcgcac ctcggtcaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcctaac aagaagccgt 7620  
ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc 7680



ggagccaaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggg 7740  
gcctccactc gcacaatcca acgcttgitt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt 7800  
gcgaaagctc gccgtgacaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa 7860  
atcgccgaag cgatggaact ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacgcccgc 7920  
aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg ggttgtcggg 7980  
ttccggccgg cgctcggcac tcggaccggc cggcggatgg tgttctgcct ctggcgcagc 8040  
gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac 8100  
agcctgtgat tggatgatcc gtcacgctc gaccgctacc tgttcagctg ccgcccgtg 8160  
ggcatgagca acggccaact ctcgttcaa 8189

<210> 111

<211> 8183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LNH2

<400> 111

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatecgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggg gtggagtica tcgaggctta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540

gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtaatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggacgcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctccggtttc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg ttcccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca caccgcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggtaactgc ggccctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcaactat gcgtgctgct agcgtatata gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctccgagcac tgtccgaccg ctttgccgcg cggccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgat gggaagatcg ggctcgccac ttccgggtca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccctgagg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gaticgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacct 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggaig gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggccggcatcg ggatgcccgc 2280

gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg ctcgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtacgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcg cctgctcgt cagagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgcctg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtcgaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgccctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatccctcg caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactcccg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgccctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cctttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttgtctcacc 4020

cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggatgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcagg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgctcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt ttigtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760

gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtag tcaccaaccg gggiggaacg 5880  
gcgccgggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgigtigc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatgggt atggatgatgt cctcgagatc taagcttggg tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcctcatgtt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6120  
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6180  
ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc ggccgtggga gcccgccctc 6240  
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tcctggggccg cgatactcga ccaccacgca 6300  
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6360  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6420  
caaccaccga ccacgttcc gctctgcgcg ccgtaccga cctacctcc gcagctcgaa 6480  
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgctgtgtc caccatccac cgacgcaaag 6540  
cccaaccga gcacacctt tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgcagggtt 6600  
ccagaagaaa tcgaacgac cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6660  
aggttttggg ggggtgtgcc gggatacctg atatggcttt gttttgcgta gtcgaataat 6720  
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtggcgggc acagttgcc 6780  
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa tggcgggatg cgggtgtgct 6840  
tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6900  
cgacgcattg gcaatgcgtt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6960  
catcgactgc gatcacgtt acgccgcgat gcgcgcattc gagcaacat ccgaccatcc 7020  
ggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcgca cacatcgat ggtggctcgg 7080  
cccccaaccac gtgtgccgca ccgacagcgc ccgactgacg ccactgcgct acgcccaccg 7140  
catcgaaacc ggctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7200  
caaaaaccg attcaccg attgggagac gatctacggc ccggccacc cgtacacatt 7260  
gcggcagctg gccaccatcc acacaccg gcagatgccg cgtcggcccg atcgggccgt 7320  
gggcttgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccg cgatgggcat accgcagtg 7380  
gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggacat ctgctcctgc agcactgcca 7440  
cgccgtcaac accgagtcca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgc ccaccgcga 7500

atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7560  
gcatctcggc caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7620  
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7680  
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgccctcc 7740  
actcgcacaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg attacctcgg ccgtgcgaaa 7800  
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7860  
gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7920  
ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7980  
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 8040  
taccgccgaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8100  
tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8160  
agcaacggcc aactctcgctt caa 8183

<210> 112

<211> 8123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH1

<400> 112

gagctcgacc ggcggggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggatgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggg gtggagtcca tcgaggctta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360

gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
cccgccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 480  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 540  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 600  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 660  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 720  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctgtcgttcc ggacgcgaaa aggggtgggc 780  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 840  
cgagtctctc aacgtttccg tticcctcgg aatcgcgtcg cacgagagga tcgacaggaa 900  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 960  
cgtcagtgat gatcaccica cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1020  
gtggctcggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc ctggaacgac tcgatgactc 1080  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1140  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccg ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1200  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1260  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1320  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1380  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1440  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1500  
gctacttga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1560  
ctacgccga cgcacgttg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1620  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1680  
tttcggcgctg ggtatggttg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1740  
gcatgcacca ttcttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1800  
cctaattcag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1860  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1920  
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgc ggcagcgtc tgggtcattt tcggcgagga 1980  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2040  
cgccctcgct caagccttcg tcactggctc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2100

cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2160  
aggctggatg gccttcccca ttaigattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgcccgc 2220  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2280  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgacgtca cggcgattta 2340  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2400  
tgtctgccic cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2460  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2520  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacctt tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2580  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2640  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2700  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta ctigcaacgt tgcaactcct agtgtttgta 2760  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2820  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2880  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 2940  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3000  
tgttctaccg ggagctgggc tccccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3060  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3120  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3180  
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3240  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3300  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3360  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3420  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3480  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3540  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3600  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactccgg 3660  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctecgtc 3720  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3780  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3840



gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3900  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 3960  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggatgcacga gtgggttaca 4020  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4080  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg 4140  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4200  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4260  
taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4320  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4380  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4440  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4500  
taatagactg gatggaggcg gataaagtig caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4560  
ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4620  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4680  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4740  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4800  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4860  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4920  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag 4980  
cggtaggttg ttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5040  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5100  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5160  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5220  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5280  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgcct ccgaaggga 5340  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5400  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtccigtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5460  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5520  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 5580

tatccccctga ttctgtggat aaccgtatta cgccttttga gtgagctgat accgctcgcc 5640  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5700  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttgccga ttcatatg cagctggcac gactagagtc 5760  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtag tcaccaaccg gggtagaacg 5820  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5880  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 5940  
cgactagttc agtgatgggt atgggtgatgt cctcgagatc taagcttggg tccgcggccg 6000  
ctacgtagaa tccccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6060  
ccgtccacgc tgcctctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtagcacg 6120  
ccgtgagccg ccgctgccc tgggtccct cagcccgggc ggccgtggga gccgcctcg 6180  
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tctggggccg cgatactcga ccaccacgca 6240  
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6300  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6360  
caaccaccga ccacgttcc gctctgcgc ccgtaccga cctacctccc gcagctcgaa 6420  
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6480  
cccaaccga gcacacctct tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgcagggtt 6540  
ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcgga aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6600  
aggttttggg ggggtgtgcc gggatactg atatggcttt gttttgcgta gtcgaataat 6660  
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtgggcgggc acagttgcc 6720  
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgtgag cgatcgcaa tgggcggatg cgggtgtgt 6780  
tccgcaccgg ccgttcgca cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgca 6840  
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6900  
catcgactgc gatcacgttg acgcccgat gcgcgcatc gagcaacct ccgaccatcc 6960  
ggcgccgaac tgggtgtcac aatcgccgtc cggccgcga cacatcggt ggtggctcgg 7020  
cccaaccac gtgtgccga ccgacagcgc ccgactgac cactgctc acgcccaccg 7080  
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7140  
caaaaaccg attcaccg attgggagac gatctacggc ccggccaccg cgtacacatt 7200  
gcggcagctg gccaccatcc acacaccg gcagatgccg cgtcggccc atcgggcccgt 7260  
gggcctgggc cgcaacgca ccatgttcga cgccaccg cgatgggcat accgcagtg 7320

gtggcaacac cgaaacggaa cgggccgga ctgggacat ctggtcctgc agcactgcca 7380  
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcgca 7440  
atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7500  
gcatctcggc caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7560  
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7620  
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgcctcc 7680  
actgcacaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg attacctcgg ccgtgcgaaa 7740  
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7800  
gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7860  
ggcgagatit cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7920  
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 7980  
taccgccgaa ggctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8040  
tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgcc gctgggcatg 8100  
agcaacggcc aactctcgtt caa 8123

<210> 113

<211> 8184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH2

<400> 113

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgtttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240

gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccica tgcacagcat 300  
cgcgcccggg gtggagttca tcgaggctca cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtiga 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcga aaagggtggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tticcctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatategag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccg ggtggaatgc ccccggcacc cgggccttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcaccggtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgttg cggcattcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgctta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttcttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980

ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcactgggcc cgccacaaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgcg 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc ccgcggttgc gtcgcgggtc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgta 2820  
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acagggtggc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tggttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gttctcgtc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720

gccacgacca cgcgcgtccc gtacgcgcac acctcggigc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcacitit cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatitgt ttatititct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtatitcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt ccctitititg cggcatititg ccttccgtgt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagitt tcgccccgaa gaacgtititc 4140  
caatgatgag cactititaaa gttctgtctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagitt caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccitt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgiagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgctt acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460

ticcaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccctttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccttga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcatlaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggg ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtagaacg 5880  
gcgccggtag cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcggtgtgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtaggt 6000  
cgactagtgc agtgatggg atggtagtgt cctcgagatc taagcttga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa tccccatat tatactcct tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac 6120  
gccgtccacg ctgcctcctc acgtgacgtg aggtgcaagc ccggacgttc cgcgtgccac 6180  
gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg cggccgtggg agcccgctc 6240  
gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc ctctggggc gcgatactcg accaccacgc 6300  
acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg 6360  
cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccgagc agaagagtga 6420  
acaaccaccg accacgttc cgctctgcgc gccgtaccg acctacctc cgcagctcga 6480  
agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaa 6540  
gccaaccgg agcacacctc ttgcaccaag gtgccgaccg tggctttccg ctgcaggggt 6600  
tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc aaggttcaaa aagcaggggt tggtagggag 6660  
gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct gatattggct tgttttgcgt agtcgaataa 6720  
ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc gaatagtga tgtggcgggg cacagttgcc 6780  
ccatgaaatc cgcaacgggg ggcgtgctga gcgatacggc atgggcggat gcggtgttgc 6840  
ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg tcagtaccg atgagccgcg 6900  
acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg 6960  
tcatcgactg cgatcacgtt gacgccgca tgcgcgcatt cgagcaacca tccgaccatc 7020  
cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt ccggccgcgc acacatcgga tggtaggctcg 7080  
gccccaacca cgtgtgccgc accgacagcg cccgactgac gccactgcgc tacgcccacc 7140  
gcatcgaaac cggcctcaag atcagcgtcg gcggcgatit cgcgtatggc gggcaactga 7200

ccaaaaaccc gattcacccc gattgggaga cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat 7260  
tgccggcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc gcgtcggccc gatcggggccg 7320  
tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccacccg gcgatgggca taccgcagct 7380  
ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca tctcgtcctg cagcactgcc 7440  
acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttcac cgaagtacgc gccaccgcgc 7500  
aatccatctc caaatggatc tggcgcgaatt tcaccgaaga acagtaccga gcccgcacaag 7560  
cgcatctcgg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa 7620  
acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc gattatctga tgggcggagc 7680  
caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc agcagcagca gccgaaaaat tcggtgcctc 7740  
cactcgcaca atccaacgct tgtttgctga gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa 7800  
agctcgccgt gacaaagctg tcgagctgcg gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc 7860  
cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgattia ctgcacgacg cccgcaggca 7920  
cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttccg 7980  
gccggcgctc ggcactcgga ccggccggcg gatggtgttc tgcctctggc gcagcgtcag 8040  
ctaccgccga aggcctgtca tcgaccggct tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct 8100  
gtgattggat gatccgctca cgctcgaccg ctacctgttc agctgccgcc cgctgggcat 8160  
gagcaacggc caactctcgt tcaa 8184



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10209

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68,  
C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68,  
C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq,  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/03521 A1 (LASTER M.C.), 08 February, 1996 (08.02.96), & AU 9531311 A & EP 772691 A1 & US 5654169 A & US 5726039 A & JP 10-503090 A	1-2, 7-11, 16-18
X	MUJACIC, M. et al., Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in Escherichia coli: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein., Gene 1999, Vol.238, No.2, pages 325 to 332	1-2, 7-11, 16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not  
 considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing  
 date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
 cited to establish the publication date of another citation or other  
 special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
 means  
 "P" document published prior to the international filing date but later  
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
 priority date and not in conflict with the application but cited to  
 understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
 step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered to involve an inventive step when the document is  
 combined with one or more other such documents, such  
 combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 September, 2003 (16.09.03)

Date of mailing of the international search report  
30 September, 2003 (30.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10209

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE MOT, R. et al., Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NI86/21 and construction of <i>Escherichia coli</i> - <i>Rhodococcus</i> shuttle vectors., <i>Microbiology</i> 1997, Vol.143, Pt.10, pages 3137 to 3147	1-42
Y	JP 10-248578 A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 22 September, 1998 (22.09.98), (Family: none)	1-42
Y	EP 1127943 A2 (ENITECNOLOGIE SPA), 29 August, 2001 (29.08.01), (Family: none)	1-42
Y	TAKANO, E. et al., Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in <i>Streptomyces</i> spp., <i>Gene</i> 1995, Vol.166, No.1, pages 133 to 137	1-42
Y	ENGUITA, F.J. et al., An inducible expression system of histidine-tagged proteins in <i>Streptomyces lividans</i> for one-step purification by Ni <sup>2+</sup> affinity chromatography., <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 1996, Vol.137, Nos. 2 to 3, pages 135 to 140	1-42
X	LOWELL, C.A. et al., Structure of the murine serum amyloid A gene family: Gene conversion., <i>J.Biol. Chem.</i> 1986, Vol.261, No.18, pages 8442 to 8452	42
X	KAWAI, J. et al., Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection., <i>Nature</i> 2001, Vol.409, No.6821, pages 685 to 690	42
X	WO 01/48192 A1 (GENESIS RES. & DEV. CORP. LTD.), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 200124134 A & US 6380362 B1	42
X	VAN DER VLIET, H.N. et al., Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration., <i>J.Biol.Chem.</i> 2001, Vol.276, No.48, pages 44512 to 44520	42
X	GRUSBY, M.J. et al., Molecular cloning of mouse cathepsin D., <i>Nucleic Acids Res.</i> 1990, Vol.18, No.13, page 4008	42
X	DEGEN, S.J. et al., Characterization of the cDNA coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2., <i>DNA Cell Biol.</i> 1990, Vol.9, No.7, pages 487 to 498	42

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10209

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EVANS, B.A. et al., Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus., J.Biol.Chem. 1987, Vol.262, No.17, pages 8027 to 8034	42
X	BARON, W.F. et al., Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages., Gene 1998, Vol.215, No.2, pages 291 to 301	42
X	SHIOKAWA, D. et al., DLAD, a novel mammalian divalent cation-independent endonuclease with homology to DNase II., Nucleic Acids Res. 1999, Vol.27, No.20, pages 4083 to 4089	42
X	FERRARI, S. et al., The mouse gene coding for high mobility group 1 protein(HMG1)., J.Biol.Chem. 1994, Vol.269, No.46, pages 28803 to 28808	42
X	TEKKI-KESSARIS, N. et al., Characterization of the mouse Kid1 gene and identification of a highly related gene, Kid2., Gene 1999, Vol.240, No.1, pages 13 to 22	42
X	OLTVAI, Z.N. et al., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death., Cell 1993, Vol.74, No.4, pages 609-619	42
X	POSTIC, C. et al., Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNase I hypersensitive sites., Genomics 1995, Vol.29, No.3, pages 740 to 750	42
X	HOLZL, H. et al., The regulatory complex of Drosophila melanogaster 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme., J.Cell Biol. 2000, Vol.150, No.1, pages 119 to 130	42
X	ROCK, C.O. et al., Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A., J.Biol.Chem. 2000, Vol.275, No.2, pages 1377 to 1383	42
X	WONG, C.M. et al., Characterization of human and mouse peroxiredoxin-IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species., Antioxid.Redox Signal. 2000, Vol.2, No.3, pages 507 to 518	42

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/74, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02, C12Q 1/68, C07K 14/47

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/74, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02, C12Q 1/68, C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/03521 A1 (LASTER M. C.) 1996. 02. 08 & AU 9531311 A & EP 772691 A1 & US 5654169 A & US 5726039 A & JP 10-503090 A	1-2, 7-11, 16-18
X	MUJACIC, M. et al. Cold-inducible cloning vectors for low- temperature protein expression in Escherichia coli: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. Gene 1999, Vol. 238, No. 2, p. 325-332	1-2, 7-11, 16-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 09. 03

国際調査報告の発送日

30. 09. 03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DE MOT, R. et al. Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NI86/21 and construction of <i>Escherichia coli</i> - <i>Rhodococcus</i> shuttle vectors. Microbiology 1997, Vol. 143, Pt. 10, p. 3137-3147	1-42
Y	JP 10-248578 A (日東化学工業株式会社) 1998. 09. 22 (ファミリーなし)	1-42
Y	EP 1127943 A2 (ENITECNOLOGIE SPA) 2001. 08. 29 (ファミリーなし)	1-42
Y	TAKANO, E. et al. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in <i>Streptomyces</i> spp. Gene 1995, Vol. 166, No. 1, p. 133-137	1-42
Y	ENGUITA, F. J. et al. An inducible expression system of histidine-tagged proteins in <i>Streptomyces lividans</i> for one-step purification by Ni <sup>2+</sup> affinity chromatography. FEMS Microbiol. Lett. 1996, Vol. 137, No. 2-3, p. 135-140	1-42
X	LOWELL, C. A. et al. Structure of the murine serum amyloid A gene family: Gene conversion. J. Biol. Chem. 1986, Vol. 261, No. 18, p. 8442-8452	42
X	KAWAI, J. et al. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. Nature 2001, Vol. 409, No. 6821, p. 685-690	42
X	WO 01/48192 A1 (GENESIS RES & DEV CORP LTD) 2001. 07. 05 & AU 200124134 A & US 6380362 B1	42
X	VAN DER VLIET, H. N. et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. J. Biol. Chem. 2001, Vol. 276, No. 48, p. 44512-44520	42
X	GRUSBY, M. J. et al. Molecular cloning of mouse cathepsin D. Nucleic Acids Res. 1990, Vol. 18, No. 13, p. 4008	42
X	DEGEN, S. J. et al. Characterization of the cDNA coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2. DNA Cell Biol. 1990, Vol. 9, No. 7, p. 487-498	42

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EVANS, B. A. et al. Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. J. Biol. Chem. 1987, Vol. 262, No. 17, p. 8027-8034	42
X	BARON, W. F. et al. Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. Gene 1998, Vol. 215, No. 2, p. 291-301	42
X	SHIOKAWA, D. et al. DLAD, a novel mammalian divalent cation-independent endonuclease with homology to DNase II. Nucleic Acids Res. 1999, Vol. 27, No. 20, p. 4083-4089	42
X	FERRARI, S. et al. The mouse gene coding for high mobility group 1 protein(HMG1). J. Biol. Chem. 1994, Vol. 269, No. 46, p. 28803-28808	42
X	TEKKI-KESSARIS, N. et al. Characterization of the mouse Kid1 gene and identification of a highly related gene, Kid2. Gene 1999, Vol. 240, No. 1, p. 13-22	42
X	OLTVAI, Z. N. et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993, Vol. 74, No. 4, p. 609-619	42
X	POSTIC, C. et al. Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNase I hypersensitive sites. Genomics 1995, Vol. 29, No. 3, p. 740-750	42
X	HOLZL, H. et al. The regulatory complex of Drosophila melanogaster 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. J. Cell Biol. 2000, Vol. 150, No. 1, p. 119-130	42
X	ROCK, C. O. et al. Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A. J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 2, p. 1377-1383	42
X	WONG, C. M. et al. Characterization of human and mouse peroxiredoxin IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species. Antioxid. Redox Signal. 2000, Vol. 2, No. 3, p. 507-518	42

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**